



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Spermieutveckling hos tamkatt

Ålder för det första uppträdandet av färdiga spermier i
testiklarna under testikelutvecklingen
samt
immunohistokemi med GATA-4-antikroppar som
potentiellt hjälpmedel vid spermieutvecklingsstudier

Rebecca Oldenburg

*Uppsala
2015*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2015:67*

Spermieutveckling hos tamkatt

Ålder för det första uppträdandet av färdiga spermier i testiklarna under testikelutvecklingen samt immunohistokemi med GATA-4-antikroppar som potentiellt hjälpmedel vid spermieutvecklingsstudier

Sperm Development in the Domestic Cat

Age at the First Appearance of Spermatozoa in the Testes during the Testicular Development and Immunohistochemistry with GATA-4 Antibodies as a Potential Aid in Sperm Development Studies

Rebecca Oldenburg

Handledare: Ann-Sofi Bergqvist, Institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Eva Axnér och Margareta Wallgren,
Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Sara Persson och Lennart Söderquist,
Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Delnummer i serie: Examensarbete 2015:67

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: tamkatt, spermieproduktion, spermatogenes, immunohistokemi, GATA-4

Key words: domestic cat, sperm production, spermatogenesis, immunohistochemistry, GATA-4

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Syftet med detta arbete har varit att dels undersöka vid vilken ålder färdiga spermier börjar ses i sädeskanalerna i testiklarna hos hankatter och dels undersöka om immunohistokemi med GATA-4-antikroppar kan användas som hjälpmedel för att särskilja på olika celltyper i sädesepitelet vid spermieutvecklingsstudier hos katt.

För att besvara den första frågeställningen undersöktes H&E-färgade testikelpreparat från 46 normalkastrerade hankatter med en ålder på mellan 2,5 månader och 5 år. Undersökningen gjordes med hjälp av ett ljusmikroskop med 100-1000 gångers förstoring. Spermieförekomst observerades hos 0/3 katter som var yngre än 5 månader, 2/4 katter som var 5 – 5,5 månader gamla, 7/7 katter som var 6 – 6,5 månader gamla, 6/8 katter som var 7 månader gamla och 23/24 katter som var 8 månader eller äldre. Slutsatsen i denna studie var att det finns en individuell variation för när spermier börjar ses i testiklarna hos hankatter men generellt börjar inte spermier dyka upp förrän tidigast när hankatterna uppnått 5 månaders ålder och vid 8 månaders ålder har generellt alla hankatter spermier.

För att besvara den andra frågeställningen genomfördes GATA-4-immunohistokemi på paraffinbäddade testikelpreparat från 21 normalkastrerade hankatter med en ålder på mellan 4,5 månader och 5 år. Som detektionsmetod användes ett avidin-biotin immunoperoxidassystem med DAB som kromogen. Som negativ kontroll användes dels normal get-IgG och dels PBS. Preparaten undersöktes med hjälp av ett ljusmikroskop med 100-1000 gångers förstoring. I både GATA-4-glasen och get-IgG-kontrollerna sågs ett genomgående problem med mycket bakgrundsfärgning. PBS-kontrollerna var däremot alla helt negativa. Hos samtliga katter med spermatider sågs i GATA-4-glasen, men inte i någon av de negativa kontrollerna, en positiv reaktion i både de runda och de elongerade spermatiderna. Den positiva färgningen – vilken bedömdes representera en färgning av akrosomen – varierade i styrka dels inom och dels mellan de olika preparaten. I de områden där en stark akrosomfärgning observerades var det väldigt lätt att dels identifiera spermatiderna och dels se i vilket stadium av spermiogenesen dessa befann sig. I de områden där endast en svag färgning av akrosomerna observerades drunknade däremot dessa signaler i bakgrundsfärgningen och akrosomfärgningen var därför inte till någon större hjälp för att identifiera spermatiderna. De övriga typerna av könsceller – spermatogonier, spermatocyter och spermier – var alla negativa. Sertolicellerna var negativa hos alla katter utom en; de negativa Sertolicellerna bedömdes som ett troligtvis falskt negativt resultat. Slutsatsen i denna studie var att GATA-4-immunohistokemi har potential för att underlätta särskiljandet mellan olika celltyper i sädesepitelet men att det finns en rad problem som först måste åtgärdas innan det kan användas som ett effektivt hjälpmedel. Problemen med den kraftiga bakgrundsfärgningen och de negativa kontrollerna som inte är negativa måste lösas. Det vore också önskvärt om det gick att få ett jämnare resultat av akrosomfärgningen. Om det dessutom går att få en positiv färgning av Sertolicellerna skulle användbarheten av GATA-4-immunohistokemi som redskap öka ytterligare.

SUMMARY

The first aim of this thesis has been to investigate the age at which spermatozoa first appear in the seminiferous tubules of tomcats. The second aim has been to investigate if immunohistochemistry with GATA-4 antibodies could be used as an aid to distinguish between different cell types in the seminiferous epithelium in sperm development studies in cats.

In order to answer the first question, H&E stained testicular sections from 46 tomcats were examined. The cats ranged from 2.5 months to 5 years in age and underwent routine castration. The examination was conducted with a light microscope with a magnification of 100-1000 times. Spermatozoa were observed in 0/3 of the cats younger than 5 months, 2/4 of the cats that were 5 – 5.5 months of age, 7/7 of the cats that were 6 – 6.5 months of age, 6/8 of the cats that were 7 months of age and 23/24 of the cats that were 8 months or older. It was concluded in this study that there is an individual variation for when the first appearance of spermatozoa can be observed in the testes of tomcats but generally spermatozoa are not seen before 5 months of age and by 8 months of age spermatozoa are generally seen in all cats.

In order to answer the second question, GATA-4 immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded testicular sections from 21 tomcats. The cats ranged from 4.5 months to 5 years in age and underwent routine castration. An avidin-biotin immunoperoxidase system with DAB as chromogen was used to visualize the bound antibodies. Two different negative controls were used: one with normal goat IgG and one with PBS. The slides were examined with a light microscope with a magnification of 100-1000 times. A persistent problem with strong background staining was seen in both GATA-4 slides and goat IgG negative controls. The PBS negative controls, on the other hand, were all completely negative. In the GATA-4 slides (but not the negative controls) of all cats with spermatids, a positive reaction could be seen in both the round and the elongated spermatids. The positive staining – which was interpreted as a staining of the acrosome – varied in strength both within and between different slides. In the areas where a strong acrosomal staining was observed, it was easy to both identify the spermatids and to see in which stage of spermiogenesis they were. In the areas where, on the other hand, only a weak acrosomal staining was observed, these signals were drowned by the background staining and it was consequently not very helpful for identifying the spermatids. The other germ cells – spermatogonia, spermatocytes and spermatozoa – were all negative. The Sertoli cells were negative in all cats except for one; this was, however, considered to likely be a falsely negative result. The conclusion from this study was that GATA-4 immunohistochemistry has potential for making it easier to differentiate between different cell types in the seminiferous epithelium but there are a number of problems that first have to be solved before it can be used as an effective aid. Firstly, a solution has to be found both for the strong background staining and for the negative controls that were not negative. Secondly, it would also be desirable if a more even result of the acrosomal staining could be achieved. Finally, if a positive reaction in the Sertoli cells could also be achieved, this would further increase the usefulness of GATA-4-immunohistochemistry as a tool.

INNEHÅLL

Inledning	1
Litteraturoversikt	1
Testikelns uppbyggnad.....	1
Interstitialium	1
Sädeskanaler.....	2
Sädesepitel.....	2
Lamina propria.....	2
Blod-testisbarriären.....	4
Spermatogenes.....	5
Akrosomen.....	5
Den spermatogenetiska cykeln.....	5
Tamkattens postnatale testikelutveckling ur ett histologiskt perspektiv.....	8
Immunohistokemi.....	8
Antikroppar.....	9
Monoklonala och polyklonala antikroppar.....	9
Vilseledande antikroppsreaktioner.....	11
Korsreaktioner.....	11
Kontaminerande och naturliga antikroppar.....	11
Antigendiffusion.....	11
Detektionsmetoder.....	12
Direkt immunohistokemi.....	12
Indirekt immunohistokemi.....	12
Märkningar.....	13
ABC-metoden.....	13
Förbehandlingssteg.....	15
Avparaffinering och rehydrering.....	15
Epitopåtervinning.....	15
Blockning av endogen avidin-bindande aktivitet.....	16
Blockning av endogen enzymaktivitet.....	17
Blockning av ospecifik vidhäftning.....	17
GATA-4.....	20
Uttrycksmönster i testikeln.....	20
Mus.....	20
Gris.....	22
Människa.....	22
Användningsområden inom immunohistokemin.....	23
Material och metoder	24
Material.....	24
Metoder.....	24
Bedömning av celler i spermatogenesen.....	24
Immunohistokemi med GATA-4.....	24

Resultat	27
Bedömning av celler i spermatogenesisen.....	27
Immunohistokemi med GATA-4.....	29
Ursprungsprotokollet och protokoll version 2.....	29
Protokoll version 3 och 4.....	29
<i>Bakgrundsfärgning</i>	30
<i>Könsceller</i>	31
<i>Sertoliceller och Leydigceller</i>	33
<i>Katt med avvikande resultat</i>	33
Diskussion	34
Bedömning av celler i spermatogenesisen.....	34
Individuell variation och rasskillnader.....	34
Katten K44.....	34
Resultatjämförelse med andra studier.....	34
<i>Studie i vilken fokus specifikt legat på spermieförekomst</i>	35
<i>Övriga studier</i>	35
Immunohistokemi med GATA-4.....	36
Könsceller.....	36
<i>Spermatider</i>	36
<i>Övriga könsceller</i>	37
Sertoliceller.....	37
<i>Fixering</i>	37
<i>Epitopåtervinning</i>	38
<i>Vävnadsnedbrytning</i>	38
<i>Antikroppar</i>	38
Negativa kontroller.....	38
Bakgrundsfärgning.....	38
Konklusion	39
Frågeställning 1: Spermieförekomst.....	39
Frågeställning 2: GATA-4-immunohistokemi.....	39
Referenser	40

INLEDNING

Jämfört med många andra djurslag, som t.ex. nötkreatur, finns det i den vetenskapliga litteraturen relativt lite inom ämnet andrologi hos tamkatt, *Felis catus*, (Kustritz, 2014) och särskilt få studier verkar det finnas som fokuserar på testikelutvecklingen hos detta djurslag. Av den anledningen har i detta arbete följande frågeställning valts: Vid vilken ålder börjar färdiga spermier ses i sädeskanalerna i testiklarna hos tamkatt under testikelutvecklingen?

Spermier utvecklas genom en stegvis process och genomgår längs vägen en rad olika utvecklingsstadier vilka grovt kan indelas i tre huvudsakliga celltyper: spermatogonium, spermatocyt och spermatid. Ett sätt att underlätta särskiljandet av dessa olika celltyper i sädesepitelet skulle kunna vara att färga den s.k. akrosomen, som är en cellkomponent i spermatiderna men inte i spermatogonier eller spermatocyter. Transkriptionsfaktorn GATA-4 har i studier på testikelvävnad använts som en immunohistokemisk markör för Sertolicellkärnor (Southwood *et al.*, 2012; Gassei & Orwig, 2013; Hussain *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2014), men i flera studier på råtta (McClusky *et al.*, 2009), hund (Owston & Ramos-Vara, 2007; Ramos-Vara & Miller, 2009) och mus (Ketola *et al.*, 2002; Kyrölähti *et al.*, 2011; Southwood *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2013) har en viss typ av GATA-4-antikropp även visat sig ge en tydlig färgning av akrosomen. Om denna typ av GATA-4-antikropp skulle visa sig ge en akrosomfärgning även hos tamkatt skulle det kunna vara till hjälp vid spermieutvecklingsstudier på detta djurslag. Av denna anledning har också följande frågeställning valts: Kan immunohistokemi med GATA-4 användas som hjälpmedel för att särskilja på olika celltyper i sädesepitelet vid studier av spermieutveckling hos tamkatt?

LITTERATURÖVERSIKT

Testikelns uppbyggnad

Testikelvävnaden brukar indelas, både morfologiskt och funktionsmässigt, i två olika avdelningar, nämligen interstitium och sädeskanaler.

Interstitium

Den interstitiella vävnaden omger sädeskanalerna och utgörs till stor del av bindväv, blodkärl och lymfkärl. I den interstitiella vävnaden finns också grupper av Leydigceller som producerar hanliga könshormoner, huvudsakligen testosteron. De hanliga könshormonerna behövs bl.a. för utvecklandet av de sekundära könskaraktärerna och för spermatogenesen. (Damber & Söder, 1994; Wrobel & Bergmann, 2006; Gartner & Hiatt, 2007; Schatten & Constantinescu, 2007; Mescher, 2013)

Sädeskanaler

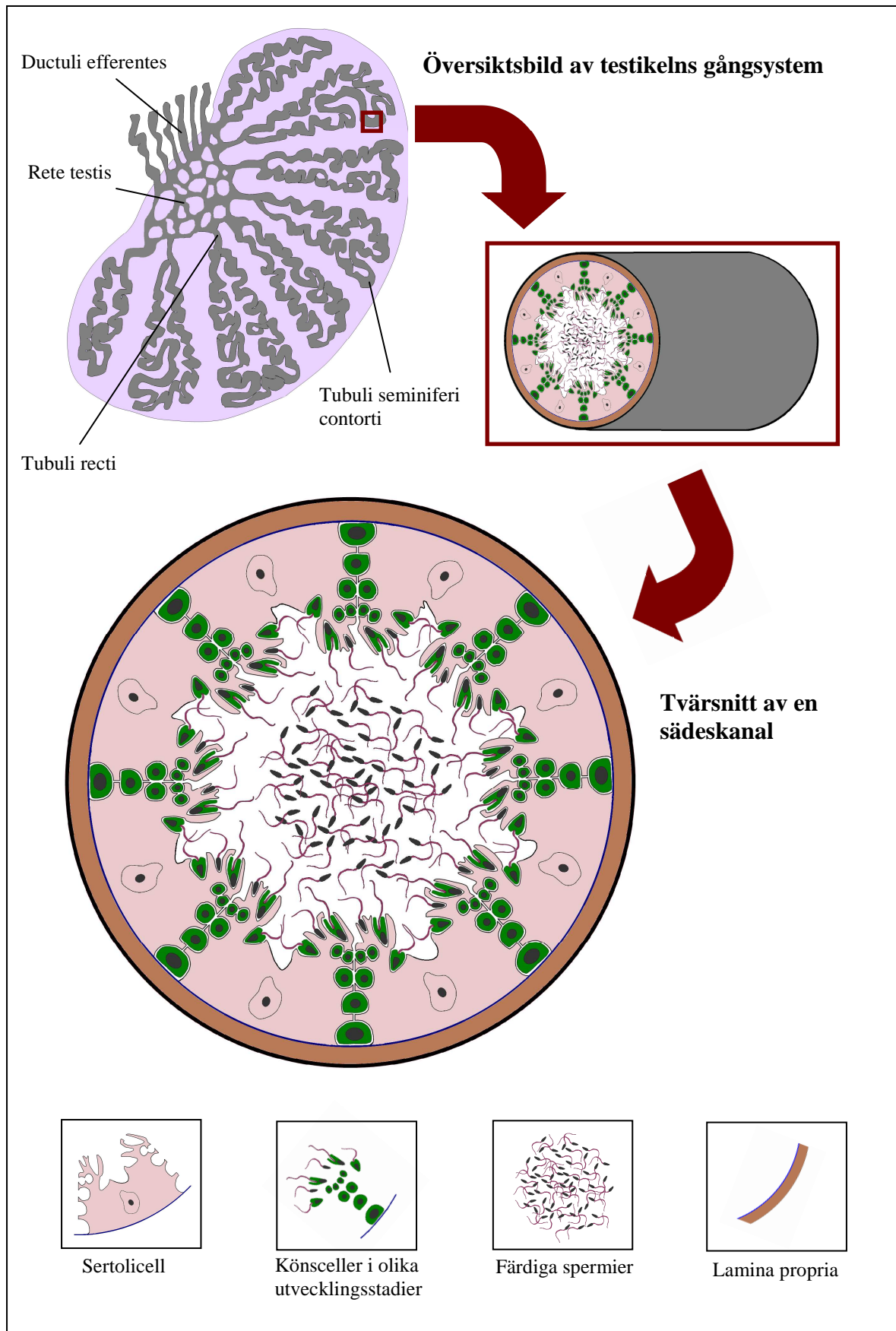
De hanliga könscellerna produceras inne i testikelns vindlande sädeskanaler, de s.k. tubuli seminiferi contorti. Varje sådan sädeskanal är formad som en dubbeländad loop vars ändar mynnar ut i en gemensam kort, rak utförsgång. De raka utförsgångarna – tubuli recti – från de otaliga sädeskanalerna ansluter sig sedan till ett nätverk av anastomoserande gångar, det s.k. rete testis. Detta nätverk tömmer sig därefter i sin tur till bitestikeln via ett mindre antal utförsgångar som kallas för ductuli efferentes. I Figur 1 ses en schematisk översiktssbild av hur testikelns gångsystem är organiserat. (Damber & Söder, 1994; Wrobel & Bergmann, 2006; Gartner & Hiatt, 2007; Schatten & Constantinescu, 2007; Mescher, 2013)

Sädesepitel

Invändigt bekläds sädeskanalernas väggar av en unik typ av epitel, det s.k. sädesepitelet. Sädesepitelet är unikt på så vis att det skulle kunna ses som både ett enkelt och ett flerskiktat epitel i ett. Den enkelskiktade komponenten och huvudstommen i sädesepitelet utgörs av de s.k. Sertolicellerna. Dessa är stora, höga cylindriska celler som sträcker sig över hela epitelets höjd, ända nedifrån epitelets basala del upp till dess apikala. Sertolicellerna har en både strukturellt och metabolt stöttande funktion av sädesepitelets andra celltyp, könscellerna, vilka dels ligger inskjutna mellan angränsande Sertoliceller och dels ligger omfamnade av cellmembranet i de apikala delarna av Sertolicellerna. Detta arrangemang innebär att utlinjeringen av både den apikala och de laterala delarna av en Sertolicells cellmembran är högst oregelbunden då cellmembranet anpassar sig efter formen på de könsceller som Sertolicellen omfamnar. Könscellernas olika utvecklingsstadier ligger staplade på höjden i flera skikt ovanpå varandra och utgör således den flerskiktade komponenten av sädesepitelet. Vartefter som deras utveckling framskrider migrerar de alltmer färdigutvecklade könscellerna in mot mitten av sädeskanalen, vilket betyder att desto närmre sädeskanalens centrum en könscell befinner sig desto mer färdigutvecklad kommer den att vara. I mitten av varje sädeskanal finns ett centralt lumen i vilken de färdiga spermier hamnar för borttransport från testikeln till bitestikeln. I bitestikeln mognar spermier ytterligare samt förvaras i väntan på ejakulation. I Figur 1 ses en tvärsnittsbild av en sädeskanal. (Damber & Söder, 1994; Wrobel & Bergmann, 2006; Gartner & Hiatt, 2007; Schatten & Constantinescu, 2007; Mescher, 2013)

Lamina propria

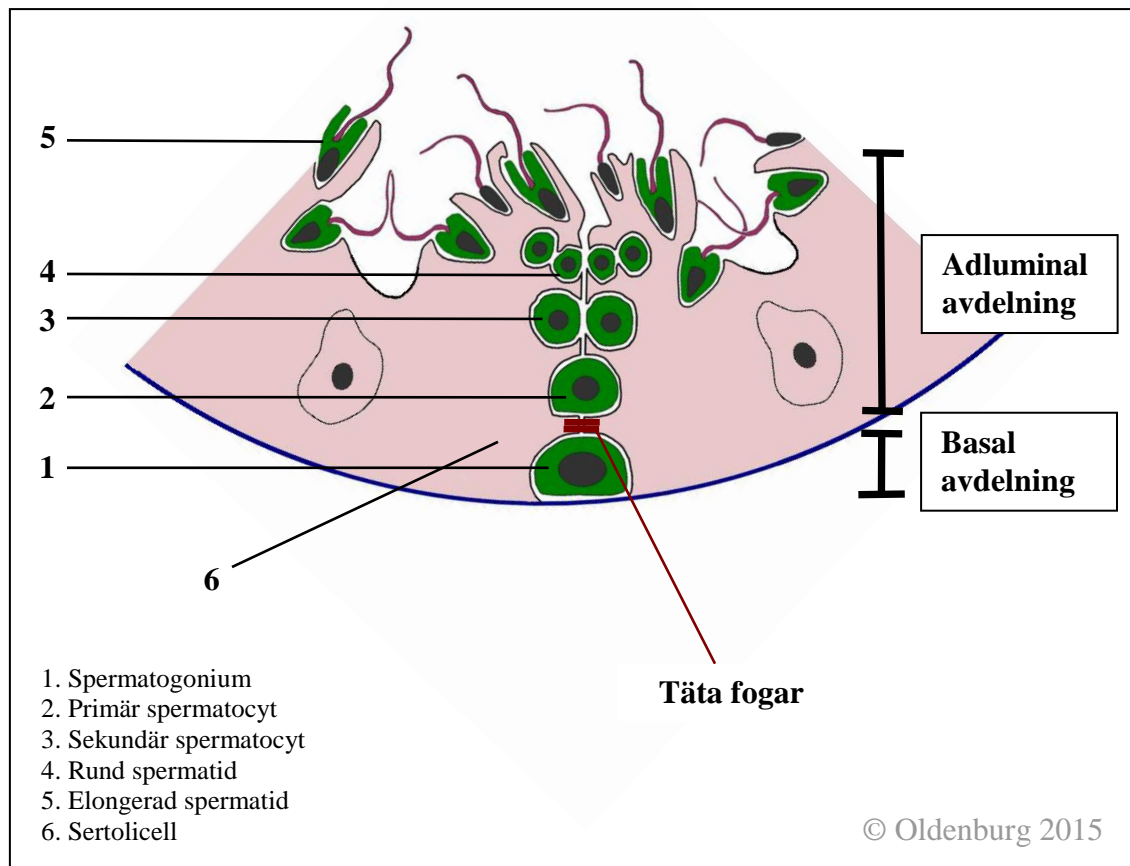
Utvändigt omges sädeskanalerna av först ett basalmembran och utanför detta en vägg bildad av huvudsakligen kollagena fibrer, fibroblaster och en typ av flata, peritubulära celler som har en kontraktile förmåga; tillsammans utgör dessa lager den s.k. lamina propria. De kontraktile peritubulära cellerna kan dra ihop sig i både cirkulär och longitudinell riktning och deltar både i spermieringen (avlossandet av färdiga spermier till lumen) och i borttransporten av sädeskanalinnehållet. (Damber & Söder, 1994; Wrobel & Bergmann, 2006; Gartner & Hiatt, 2007; Schatten & Constantinescu, 2007; Mescher, 2013)



Figur 1. Översiktsbild av testikelns gångsystem samt tvärsnittsbild av en sädeskanal. I verkligheten är antalet könsceller betydligt fler i förhållande till Sertolicellerna än vad illustrationen visar.

Blod-testisbarriären

Eftersom spermatogenesisen inte startar förrän under puberteten innebär det att immunförsvaret under sin upplärningsperiod endast lär sig känna igen könscellernas stamceller – spermatogonierna – och inte de senare utvecklingsstadierna. Immunförsvaret kommer därför att uppfatta alla de senare utvecklingsstadierna av könsceller som kroppsfrämmande och således attackera dem. Det är bl.a. för att skydda dessa celler från immunförsvaret som den s.k. blod-testisbarriären existerar. Varje Sertolicell bildar en typ av täta cellmembrankontakter, s.k. "tight junctions" eller "täta fogar", till sina intilliggande Sertolicellsgrannar. Det är dessa intercellulära fogar mellan angränsande Sertolicells basolaterala cellmembran som tillsammans bildar en barriär som isolerar utrymmet över fogarna, det s.k. adluminala utrymmet, från bl.a. immunförsvarsceller. Spermatogonierna känns igen av immunförsvaret så dessa ligger i den intercellulära avdelning som existerar mellan basalmembranet och fogarna, den s.k. basala avdelningen. När spermatogonierna delar sig och vidareutvecklas slussas dessa celler förbi de täta fogarna och kommer in i den adluminala avdelningen där immunförsvaret inte kommer åt att attackera dem och de kan utvecklas vidare till färdiga spermier. En annan funktion som blodtestisbarriären fyller är att hjälpa till att skapa en kontrollerad mikromiljö för de viktiga utvecklingsprocesser som könscellerna genomgår i den adluminala avdelningen. Figur 2 illustrerar hur de täta fogarna indelar det intercellulära utrymmet i en basal och en adluminal avdelning. (Damber & Söder, 1994; Wrobel & Bergmann, 2006; Gartner & Hiatt, 2007; Schatten & Constantinescu, 2007; Cheng & Mruk, 2012; Mescher, 2013)



Figur 2. Illustration av hur de täta fogarna indelar det intercellulära utrymmet i en basal och en adluminal avdelning. I verkligheten är antalet könsceller betydligt fler än vad illustrationen visar.

Spermatogenes

Spermatogenesen är den stegvisa process hos handjuret igenom vilken de diploida könsstamcellerna – spermatogonierna – utvecklas till haploida, hanliga könsceller, s.k. spermier. Spermatogenesen involverar en rad både celldelnings- och celldifferentieringssteg och indelas vanligtvis i tre olika huvudfaser – spermatocytogenes, meios och spermiogenes – vilka illustreras och beskrivs översiktligt i Figur 3. (Clermont, 1972; Damber & Söder, 1994; Wrobel & Bergmann, 2006; Gartner & Hiatt, 2007; Schatten & Constantinescu, 2007; Mescher, 2013)

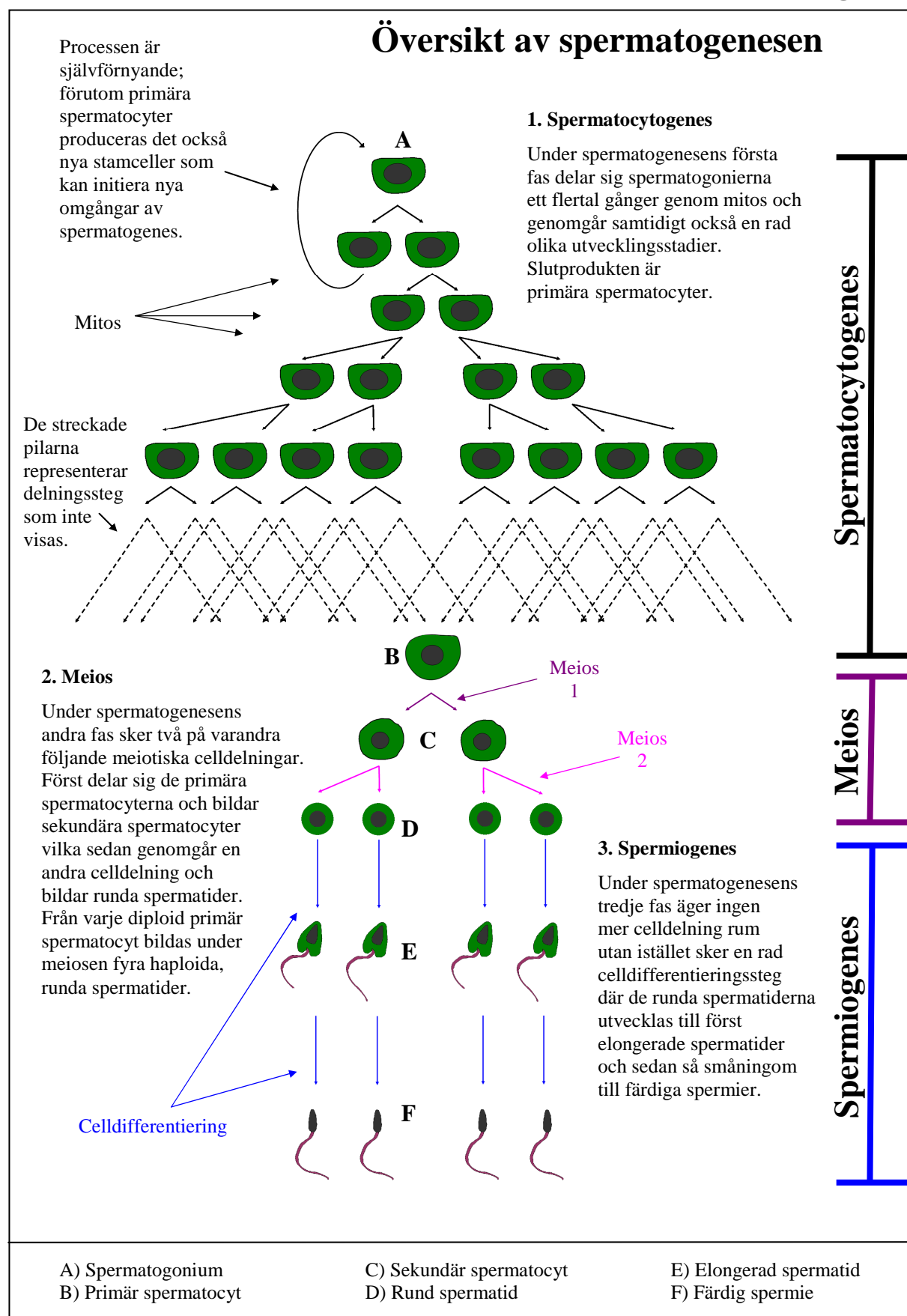
Akrosomen

Akrosomen är en membranbunden struktur som täcker större delen av spermiehuvudets främre del. Den innehåller olika hydrolytiska enzymer, vilka frisätts i samband med att spermien träffar på äggcellen. Enzymerna behövs för att spermien ska kunna penetrera de barriärer som omger äggcellen. Akrosomen utvecklas under spermiogenesen, varför denna fas av spermatogenesen illustreras i lite mer detalj i Figur 4. (Clermont, 1972; Wrobel & Bergmann, 2006; Gartner & Hiatt, 2007; Schatten & Constantinescu, 2007; Kierszenbaum & Tres, 2012; Mescher, 2013)

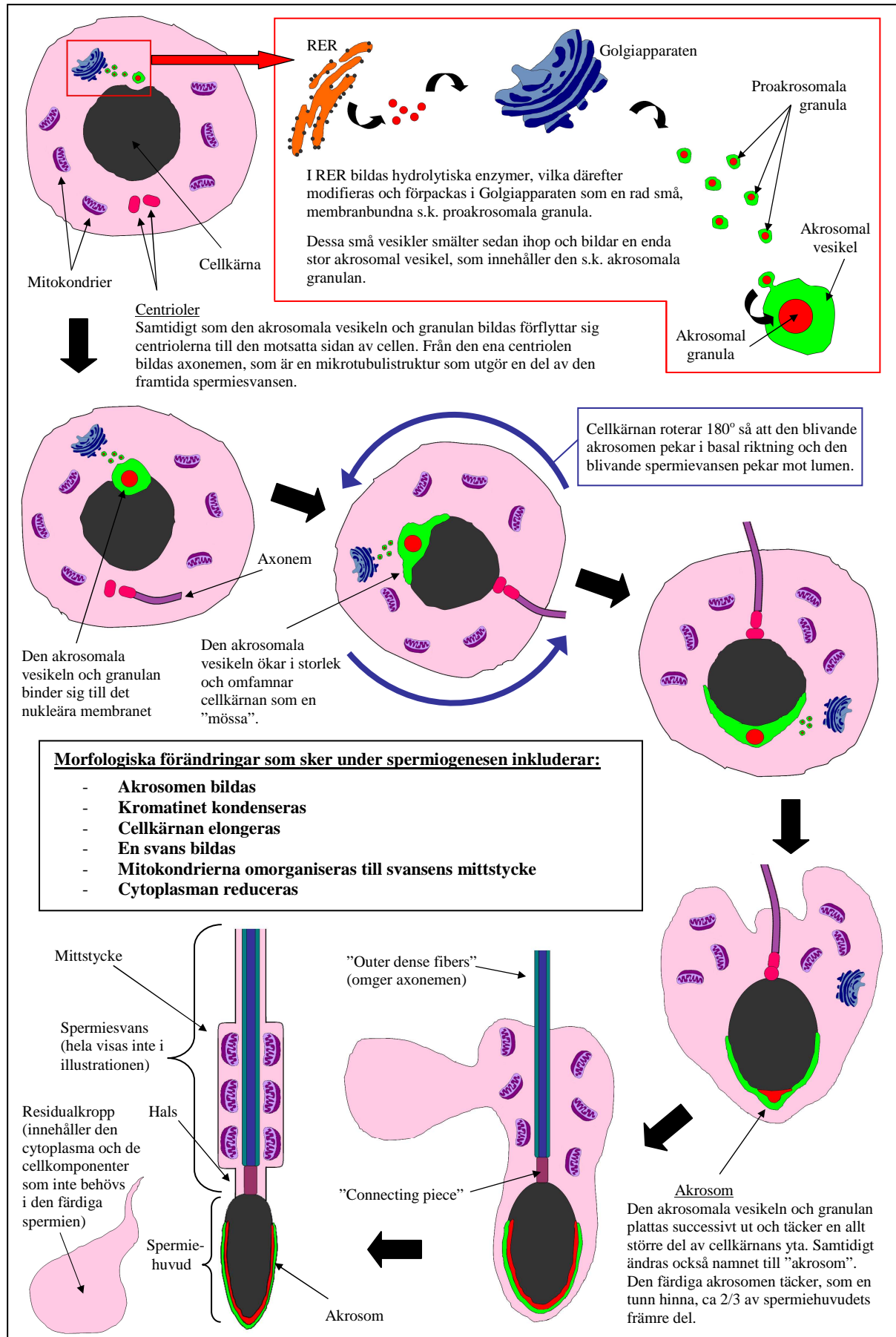
Den spermatogenetiska cykeln

Den totala tid som en fullständig omgång av spermatogenes tar är alltid konstant inom ett djurslag men varierar mellan olika djurslag (Clermont, 1972; Schatten & Constantinescu, 2007; Hess & França, 2008). Innan en omgång av spermatogenes har hunnit avslutas har på samma ställe i sädeskanalen flera nya på varandra följande omgångar startat och tiden från en spermiering till nästa på en given punkt i sädeskanalen är därför betydligt kortare än spermatogenesens totala längd (Clermont, 1972; Wrobel & Bergmann, 2006; Schatten & Constantinescu, 2007; Hess & Franca, 2008). Hos katt tar spermatogenesen totalt cirka 46,8 dagar medan spermiering från en given punkt i sädeskanalen sker cirka var 10,4:e dag (França & Godinho, 2003).

Könsceller som tillhör samma omgång utvecklas synkront och följs åt igenom spermatogenesen. När ett tvärsnitt av en sädeskanal studeras är därför celler som befinner sig i samma utvecklingsstadium grupperade tillsammans. Köncellskomponenten av sädesepitelet hos ett fullvuxet djur utgörs vanligtvis av en eller två sådana grupper av spermatogonier, en eller två grupper av spermatocyter samt en eller två grupper av spermatider. Eftersom nya omgångar av spermatogenes initieras enligt ett bestämt intervall kommer det vid varje given tidpunkt alltid att finnas ett mönster i hur långt de olika omgångarnas celler har kommit i sin utveckling i relation till varandra. Det finns ett visst begränsat antal sådana cellassociationsmönster som kommer att upprepa sig med en tydlig periodicitet. Den serie av händelser som sker från att ett visst sådant cellassociationsmönster försvinner från en given punkt inom en sädeskanal tills dess att samma mönster återigen ses på samma punkt utgör en fullständig s.k. spermatogenetisk cykel. De olika cellassociationsmönstren brukar kallas för olika stadier av den spermatogenetiska cykeln. Indelningen i stadier kan se lite olika ut beroende på vilka kriterier som har valts. (Clermont, 1972; Wrobel & Bergmann, 2006; Schatten & Constantinescu, 2007; Hess & Franca, 2008)



Figur 3. Översikt av spermatogenesisens tre olika faser.



Figur 4. Spermiogenesen.

Tamkattens postnatala testikelutveckling ur ett histologiskt perspektiv

Få studier har publicerats där man har tittat på den postnatala testikelutvecklingen hos katt ur ett histologiskt perspektiv; ett undantag är studien av Sánchez *et al.* (1993). I denna studie indelades utvecklingen i en neonatal, infantil, pubertal samt adult period.

Hos de **neonatala** katterna, vilka var mellan 1 dag och 1 månad gamla, var sädeskanalerna smala, saknade lumen och separerades av ett välutvecklat interstitium. Bortsett från enstaka, vanligtvis centralt lokaliserade, spermatogonier i vissa av sädeskanalerna bestod sädesepitelet uteslutande av omogna Sertoliceller.

Hos de **infantila** katterna, vilka var mellan 1 och 4-5 månader gamla, liknade den histologiska bilden den som observerats hos de neonatala djuren. Den tydligaste skillnaden var en klar minskning av interstitiet mellan sädeskanalerna. Spermatogonierna var fortfarande centralt lokaliserade men hade ökat i antal till ca 1-2/transversellt sädeskanalsnitt. Samtidigt hade antalet Sertoliceller sjunkit något.

Hos de **pubertala** katterna, vilka var mellan 5-7 månader gamla, sågs en blandad histologisk bild. Vissa delar av testikelparenkymet hade kommit långt i sin utveckling och hade sädeskanaler med ett centralt lumen och ett sädesepitel som börjat anta sitt karakteristiska stratifierade utseende (basalt sågs spermatogonier och centralt sågs primära och sekundära spermatocyter, vilket tolkades som att spermatogenesen hade börjat komma igång). Andra delar av parenkymet var mindre utvecklat och hade sädeskanaler som liknade dem i den infantila perioden. Sädeskanalerna separerades nu endast av ett sparsamt interstitium. Sertolicellerna hade minskat ytterligare i antal men hade i gengäld ökat i storlek och fått ett moget utseende. Blod-testisbarriären utvecklades också under denna period.

Hos de **adult**a katterna, vilka var från 8 månader och uppåt i ålder, sågs en mer enhetlig histologisk bild där samtliga sädeskanaler hade ett lumen. Spermatogenesen var nu fullständigt etablerad. Jämfört med den pubertala perioden hade också antalet Sertoliceller minskat samtidigt som sädeskanaldiametern och antalet celler i interstitiet hade ökat (Sánchez *et al.*, 1993).

Immunohistokemi

Immunohistokemi är, som namnet antyder, en blandning av immunologi, histologi och kemi. Huvudkonceptet för de immunohistokemiska metoderna är att utnyttja antikropparnas specifika antigenbindande förmåga och sedan kombinera den med en färgmärkning för att detektera och färga specifika proteiner eller andra molekylära strukturer i en vävnad så att dessa tydligt syns när vävnaden studeras i ett mikroskop. En av immunohistokemins stora fördelar är att förekomsten av en viss molekylär struktur i en vävnad inte bara kan detekteras utan dess lokalisering samt vävnadens utseende kan också samtidigt studeras, vilket ger en tydligare, mer samlad bild av den molekylära strukturens betydelse och roll i sammanhanget. Immunohistokemi, vanligtvis förkortat IHC, utnyttjas både för diagnostik och för forskning. (Harlow & Lane, 1999; Ramos-Vara & Miller, 2014)

Antikroppar

När t.ex. bakterier eller toxiner introduceras i kroppen upplever immunförsvaret många av de olika molekylära strukturerna hos dem som kroppsförsvarende och försöker uppbära ett lämpligt försvar mot det uppfattade hotet. Antikroppar är en typ av proteiner, som används av immunförsvaret dels för att direkt neutralisera sådana hot och dels för att märka upp dem som måltavlor så att andra delar av immunförsvaret kan attackera dem. Antikroppar produceras och utsöndras av aktiverade B-celler, s.k. plasmaceller, som är en typ av vita blodkroppar, som tillhör det specifika immunförsvaret. En molekylär struktur som kan framkalla en reaktion hos det specifika immunförsvaret och som kan reagera med antikroppar eller aktiverade T-lymfocyter kallas för ett antigen. (Tizard, 2013)

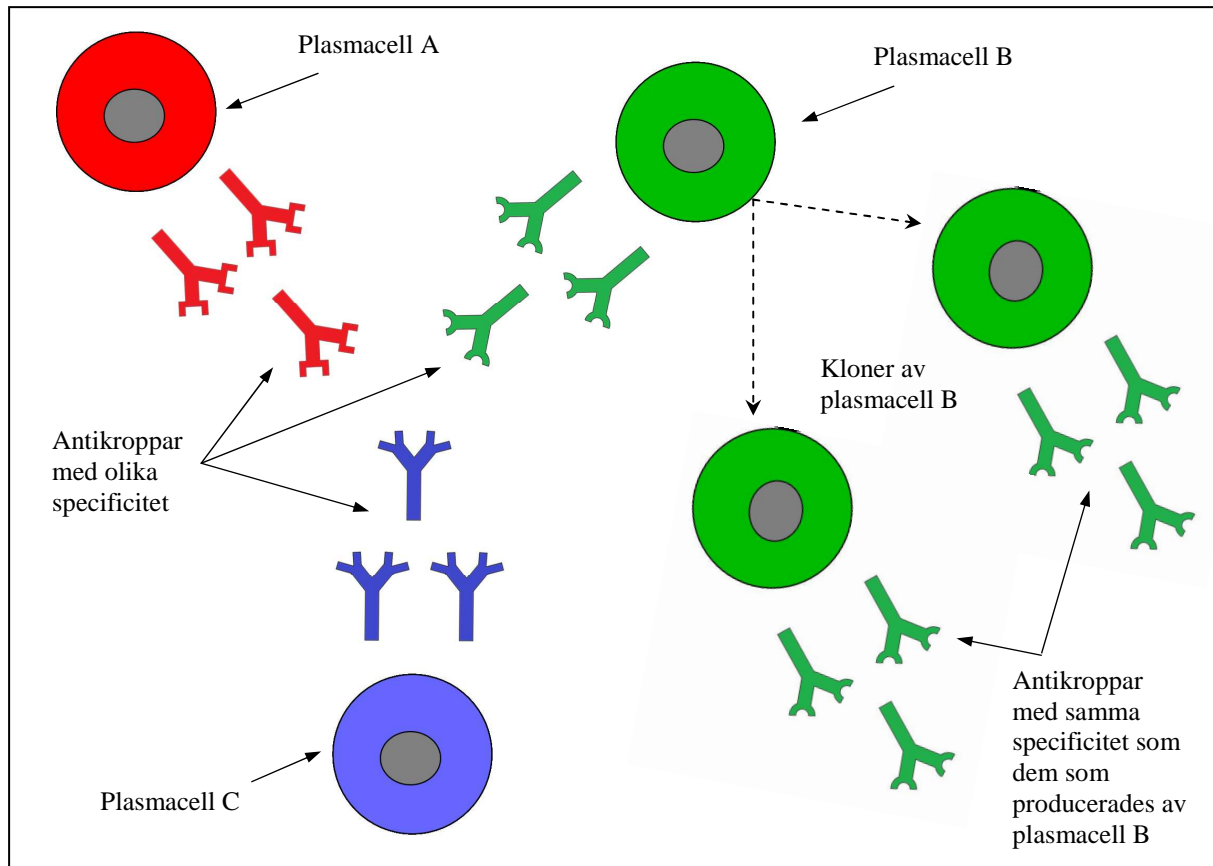
Antikropparna fungerar som ”målsökande missiler”, som känner igen och binder sig till antigenet enligt en nyckeln-i-låset-princip där det specifika antigenet, precis som en nyckel, måste passa in i formen på antikroppens antigen-bindande yta, låset, för att de ska binda till varandra. För att bindningen mellan antigen och antikropp ska bli stark krävs det en mycket bra passform dem emellan. Interaktionen mellan ett visst antigen och dess antikropp är därför mycket specifik. (Harlow & Lane, 1999; Taylor & Rudbeck, 2013; Tizard, 2013)

Antikropparna känner vanligtvis inte igen antigenet i sin helhet utan är istället skräddarsydda för att passa in och binda till en liten bit av antigenets yta; denna specifika del av antigenet som antikroppen känner igen och binder till kallas för epitop. Istället för att beskrivas som specifik för ett visst antigen, borde en antikropp därför egentligen beskrivas som specifik för en viss epitop som i sin tur är mer eller mindre specifik för ett visst antigen. Ett antigen har vanligtvis många olika epitoper på sin yta vilket gör att flera olika antikroppar med olika passform kan binda på olika ställen till det. (Harlow & Lane, 1999; Taylor & Rudbeck, 2013; Tizard, 2013)

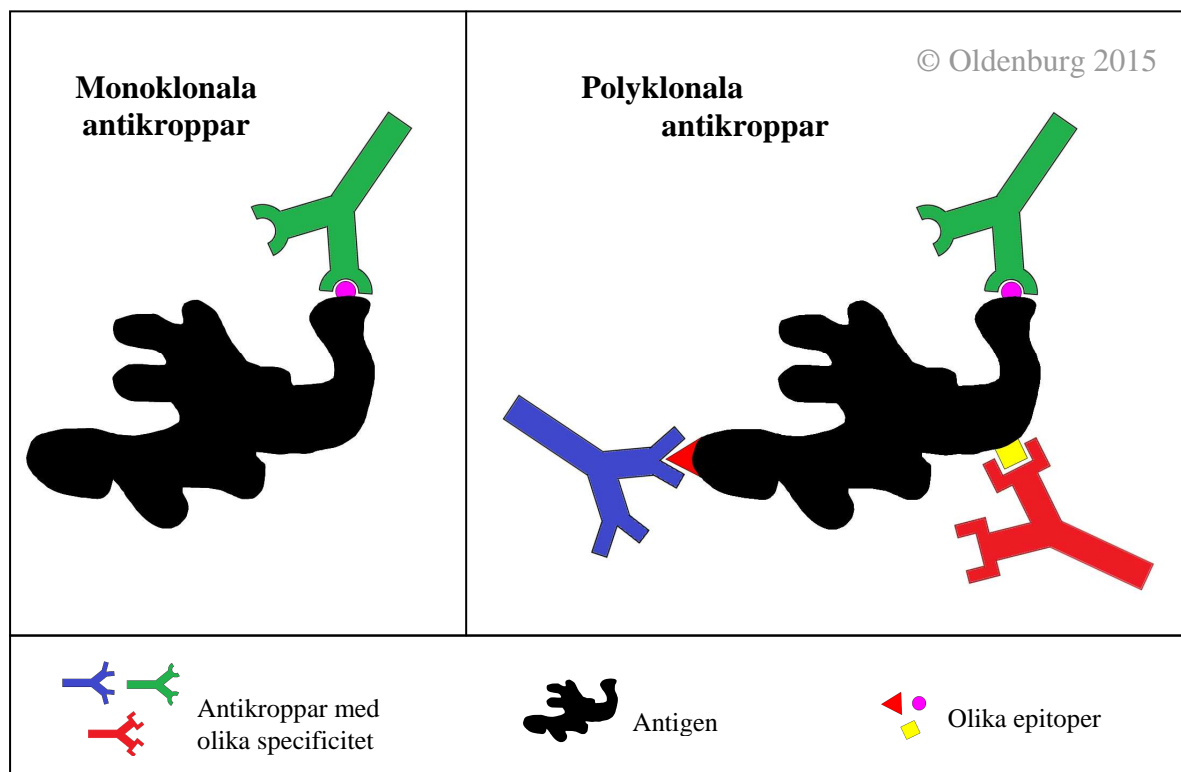
Monoklonala och polyklonala antikroppar

Varje plasmacell producerar sina egna unika antikroppar, d.v.s. alla antikroppar som produceras av en viss plasmacell kommer att vara identiska med varandra och de kommer att ha en antigenbindande yta som är unik för antikroppar från den specifika plasmacellen (och från kloner av den plasmacellen); se Figur 5. (Harlow & Lane, 1999; Taylor & Rudbeck, 2013; Tizard, 2013)

Antikropparna som används vid IHC kan antingen vara monoklonala eller polyklonala; se Figur 6. Monoklonala antikroppar är antikroppar som har producerats av kloner från en och samma plasmacell. Eftersom de är producerade av identiska cellkopior är de monoklonala antikropparna helt identiska och reagerar mot en enda epitop hos det antigen som de är framtagna för att reagera mot. Polyklonala antikroppar produceras av olika plasmaceller och är därför inte identiska och reagerar följaktligen mot flera olika epitoper hos det antigen som de är framtagna för att reagera mot. (Harlow & Lane, 1999; Taylor & Rudbeck, 2013; Tizard, 2013)



Figur 5. Varje plasmacell producerar sina egna unika antikroppar. Kloner producerar antikroppar som är identiska dem som ursprungscellen producerade.



Figur 6. Polyklonala antikroppar binder flera olika epitoper hos antigenet medan de monoklonala antikropparna bara har specificitet för en enda epitop.

Vilseledande antikroppsreaktioner

Korsreaktioner

Emellanåt händer det att en epitop delas av flera olika antigen och vissa antikroppar kan därför ibland binda även till andra antigen utöver det som de först producerades mot. Detta kallas för korsreaktivitet. Korsreaktivitet kan ibland också uppstå om en epitop är tillräckligt snarlik den riktiga epitopen för att en bindning ska kunna uppstå. Många molekylära strukturer är välbevarade mellan olika djurarter och antikroppar mot en struktur hos en djurart reagerar därför ibland med samma struktur hos en annan djurart; då sker en s.k. interspecifik korsreaktivitet, d.v.s. en korsreaktion mellan (inter) olika arter (species). (Harlow & Lane, 1999; Taylor & Rudbeck, 2013; Tizard, 2013)

Kontaminerande och naturliga antikroppar

Polyklonala antikroppar produceras genom att djur immuniseras med det intressanta antigenet och senare tappas på blod från vilket ett antiserum tas fram. I antiserumet hamnar hela den antikroppsrepertoar som djuret hade när tappningen gjordes. Utöver de önskvärda antikropparna mot det tilltänkta målantigenet kommer antiserumet även att innehålla s.k. kontaminerande och naturliga antikroppar, vilka har specificitet för irrelevanta antigen. De kontaminerande antikropparna är sådana som har producerats mot antigenkontaminanter i samband med immuniseringen (när ett antigen isoleras medföljer ofta diverse orenheter) och de naturliga antikropparna kommer ifrån andra immunreaktioner som djuret har haft mot diverse olika antigen som det har stött på "naturligt" i sin miljö. Vanligtvis brukar dessa antikroppar förekomma i så låga koncentrationer att de inte orsakar problem. Om höga antikropps-koncentrationer används kan de emellertid generera falskt positiva signaler som gör det svårt att tolka det immunohistokemiska resultatet. På grund av skillnader i produktionssätt ses vanligtvis inte problem med kontaminerande och naturliga antikroppar hos de monoklonala antikropparna. (Harlow & Lane, 1999; Taylor & Rudbeck, 2013)

Antigendiffusion

Antigendiffusion innebär att antigenet har förflyttats från sin naturliga plats och diffunderat ut i den omkringliggande vävnaden. Eftersom antigenet inte befinner sig på sin rätta plats i vävnaden ger den immunohistokemiska färgningen inte heller en korrekt bild av antigenets riktiga vävnadsutbredning. Antigendiffusion uppstår till följd av att vävnaden har skadats genom autolys eller annan menlig – antingen mekanisk, kemisk eller termisk – påverkan. Skadan behöver inte ha uppstått innan vävnadsprocessningen inleds; om vävnaden inte har blivit tillräckligt fixerad innan den efterföljande vävnadsprocessningen inleds kan själva processningen i sig leda till att inadekvat fixerade antigen förflyttas. Olika antigen är olika benägna att diffundera ut i vävnaden. En låg molekylvikt eller en extracellulär lokalisation är exempel på egenskaper som ökar risken för att ett visst antigen ska diffundera. (Taylor & Rudbeck, 2013).

Detektionsmetoder

Inom IHC utnyttjar man, som tidigare nämnts, den höga specificitet med vilken en antikropp och dess epitop binder till varandra. För att visualisera denna bindning finns en rad olika s.k. detektionsmetoder att välja mellan. Dessa kan indelas i direkta och indirekta metoder. (Harlow & Lane, 1999; Mescher, 2013; Taylor & Rudbeck, 2013)

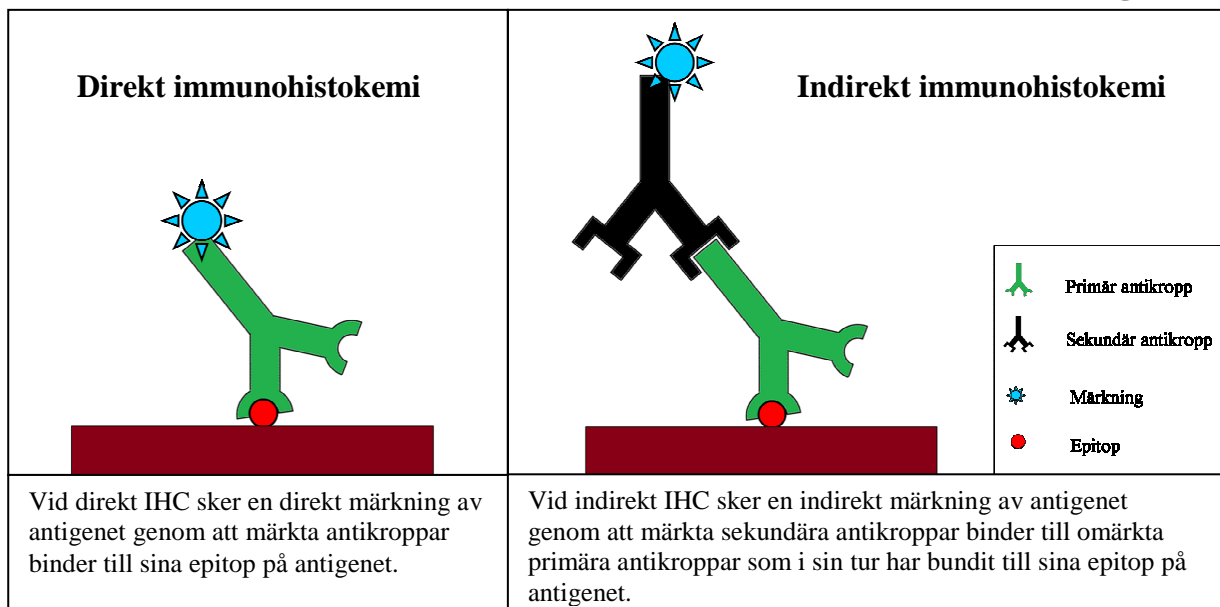
Direkt immunohistokemi

I direkt IHC fästs en märkning direkt på den primära antikroppen, d.v.s. den antikropp som är framtagen för att binda till det antigen som man är intresserad av (se Figur 7). Vävnadssnittet inkuberas tillsammans med antikroppen och efter avslutad inkubering tvättas vävnadssnittet för att avlägsna de antikroppar som inte har bundit till antigenet. För att märkningen ska bli synlig i mikroskop behöver sedan ofta vävnadssnittet genomgå ytterligare inkuberingssteg; hur dessa ser ut beror på vilken märkning som används. (Harlow & Lane, 1999; Mescher, 2013; Taylor & Rudbeck, 2013)

Indirekt immunohistokemi

Vid indirekt IHC fästs märkningen på en annan antikropp, den s.k. sekundära antikroppen, som är framtagen för att specifikt binda till den primära antikroppen (den primära antikroppen fungerar som antigen för den sekundära antikroppen); se Figur 7. Vävnadssnittet inkuberas tillsammans med först den primära och sedan den sekundära antikroppen. Efter varje avslutad inkubering tvättas vävnadssnittet för att avlägsna obundna antikroppar. Precis som i direkt IHC avgör typen av märkning hur vävnadssnittet sedan kommer att behandlas. (Harlow & Lane, 1999; Mescher, 2013; Taylor & Rudbeck, 2013)

© Oldenburg 2015



Figur 7. Direkt och indirekt immunohistokemi.

Fler än en sekundär antikropp kan binda till varje primär antikropp. Antigenet kommer därför att vara indirekt bundet av fler sekundära antikroppar vid indirekt IHC än det kommer att vara direkt bundet av primära antikroppar vid direkt IHC. Den visuella signalen amplifieras alltså av det extra bindningssteget och indirekt IHC har därför högre sensitivitet än direkt IHC. (Harlow & Lane, 1999; Mescher, 2013; Taylor & Rudbeck, 2013)

Den sekundära antikroppen är inte låst till en enda primär antikropp utan kan användas tillsammans med flera olika primära antikroppar (specifika för olika antigen) så länge dessa är tillverkade i samma värddjur (Mescher, 2013; Taylor & Rudbeck, 2013).

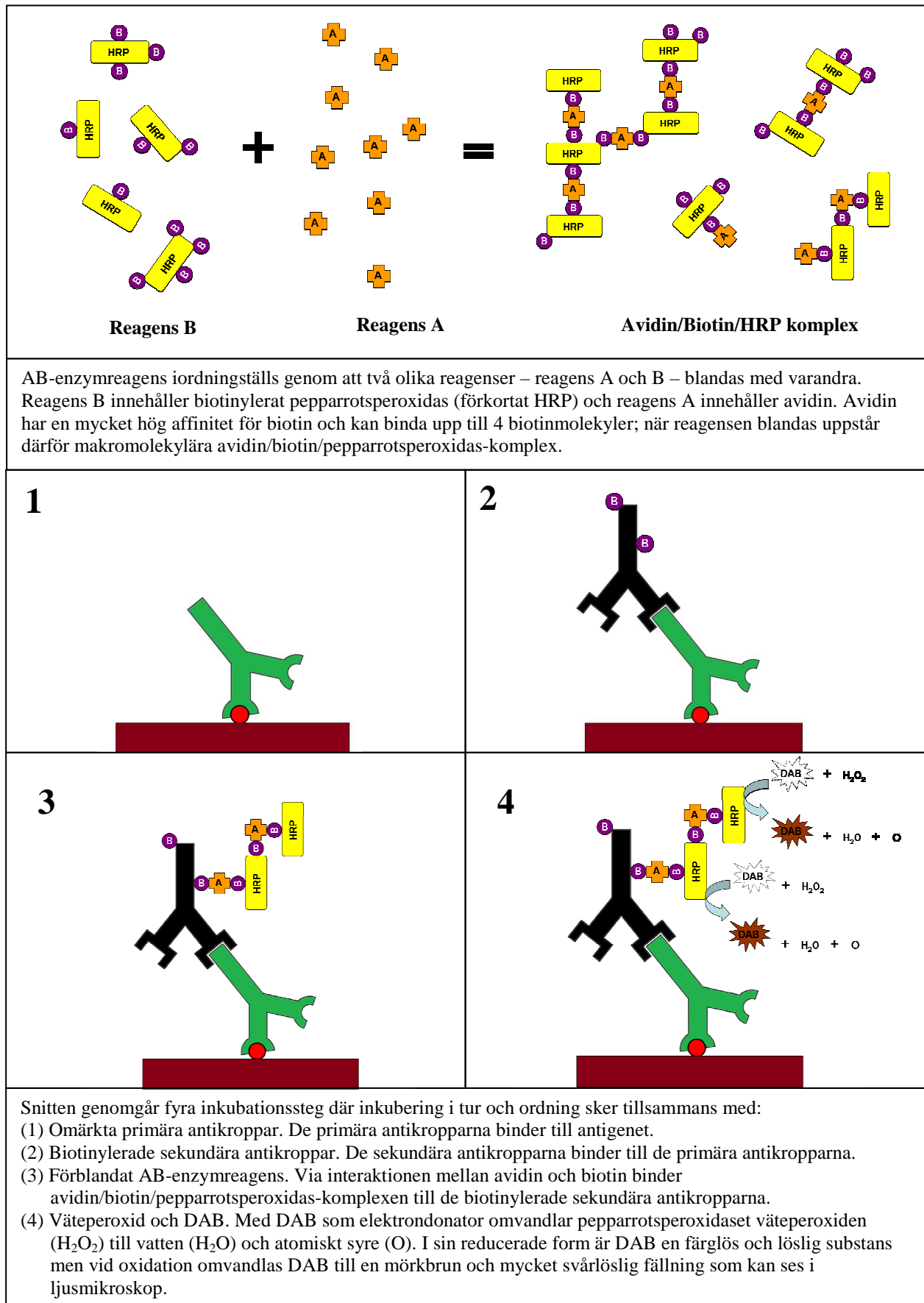
Märkningar

Det finns många olika sätt att märka primära och sekundära antikroppar på. Som märkning kan t.ex. ett fluorescerande ämne eller ett enzym användas. När enzymer används för märkning genereras den visuella signalen av att den enzymatiska reaktionen ger upphov till produkter som t.ex. har en stark färg, är fluorescerande eller som på annat sätt syns bra i ett mikroskop. Ett exempel på ett enzym som ofta används för enzymatisk märkning är pepparrotsperoxidase. I närvaro av en elektrondonator omvandlar pepparrotsperoxidase sitt substrat väteperoxid (H_2O_2) till vatten och syre. Det finns många olika substanser som kan fungera som elektrondonator i denna reaktion; ett exempel är den kromogena substansen 3,3'-diaminobenzidinetetrahydroklorid (DAB). I sin reducerade form är DAB en färglös och löslig substans men vid oxidation omvandlas DAB till en mörkbrun och mycket svårlöslig fällning som kan ses i ett vanligt ljusmikroskop. (Harlow & Lane, 1999; Bratthauer, 2010a; Taylor & Rudbeck, 2013)

ABC-metoden

Ett sätt för att associera fler märkningsmolekyler till varje antigen och på så vis amplifiera den visuella signalen och den immunohistokemiska sensitiviteten är att inte fästa märkningen direkt på antikropparna utan istället utnyttja avidin och biotin som intermediära molekyler. Biotin är en mycket liten stabil molekyl som sällan påverkar funktionen hos den struktur som den fästs på och avidin är ett protein som med hög affinitet kan binda upp till fyra stycken biotinmolekyler. Avidinets affinitet för biotin är exceptionellt hög och bindningen dem emellan är näst intill irreversibel. (Harlow & Lane, 1999; Bratthauer, 2010b; Taylor & Rudbeck, 2013)

En immunohistokemisk metod som utnyttjar avidinets och biotinets affinitet för varandra är den s.k. ABC-metoden (ABC står för engelskans avidin-biotin complex). I denna indirekta metod är de sekundära antikropparna biotinylerade, d.v.s. på deras yta har det fästs biotinmolekyler. Biotinylerade enzymmolekyler förblandas sedan med fria avidinmolekyler så att det bildas makromolekylära avidin/biotin/enzym-komplex. När sedan snitten, som redan inkuberats med först de primära och sedan de sekundära antikropparna, inkuberas tillsammans med komplexen fungerar avidinet och biotinet som de två olika delarna av ett kardborrband och fäster, genom sin interaktion med varandra, de enzyminnehållande komplexen på de sekundära antikropparna. I Figur 8 illustreras ABC-metoden med pepparrotsperoxidase som enzym och DAB som kromogen, vilket är den detektionsmetod som har använts i IHC-studien i detta arbete. (Bratthauer, 2010b; Taylor & Rudbeck, 2013)



Figur 8. Indirekt immunohistokemi med ett avidin-biotin immunoperoxidassystem med DAB som kromogen.

Förbehandlingssteg

Avparaffinering och rehydrering

För att immunohistokemi ska fungera måste antikropparna fritt kunna nå fram till alla celler och subcellulära avdelningar (Harlow & Lane, 1999). Paraffin blockerar antikropparnas åtkomst till antigenet och vid immunohistokemi på paraffinbäddade preparat måste därför allt paraffin avlägsnas och vävnaden rehydreras innan antikropparna tillsätts (Nybo, 2012; Buchwalow & Böcker, 2010). Avparaffinering görs ofta med det organiska lösningsmedlet xylen men det finns även andra kommersiellt tillgängliga alternativ att välja mellan (Buchwalow & Böcker, 2010). Rehydrering sker sedan i en graderad etanolserie med sjunkande koncentrationer och avslutas med vatten (Buchwalow & Böcker, 2010).

Epitopåtervinning

Fixering och annan vävnadsprocessning är nödvändiga steg i preparatframställning men eftersom de påverkar biokemin hos många av de molekylära strukturerna i vävnaden kan de också orsaka s.k. epitopmaskering. Vid epitopmaskering får antikropparna svårt att känna igen eller nå fram till sina epitoper på målantigenet p.g.a. att dessa epitoper antingen själva ändrat utseende eller "gömts" genom att andra omgivande strukturer ändrat utseende. Epitopmaskering kan antingen vara partiell eller fullständig och kan därför ge en försämrad eller fullständig avsaknad av antigenetektion. Även vävnadsautolys (på grund av t.ex. underfixering eller en för sent utförd fixering) kan orsaka epitopmaskering och påverka antigenetektionen negativt. (Harlow & Lane, 1999; Ramos-Vara & Miller, 2014)

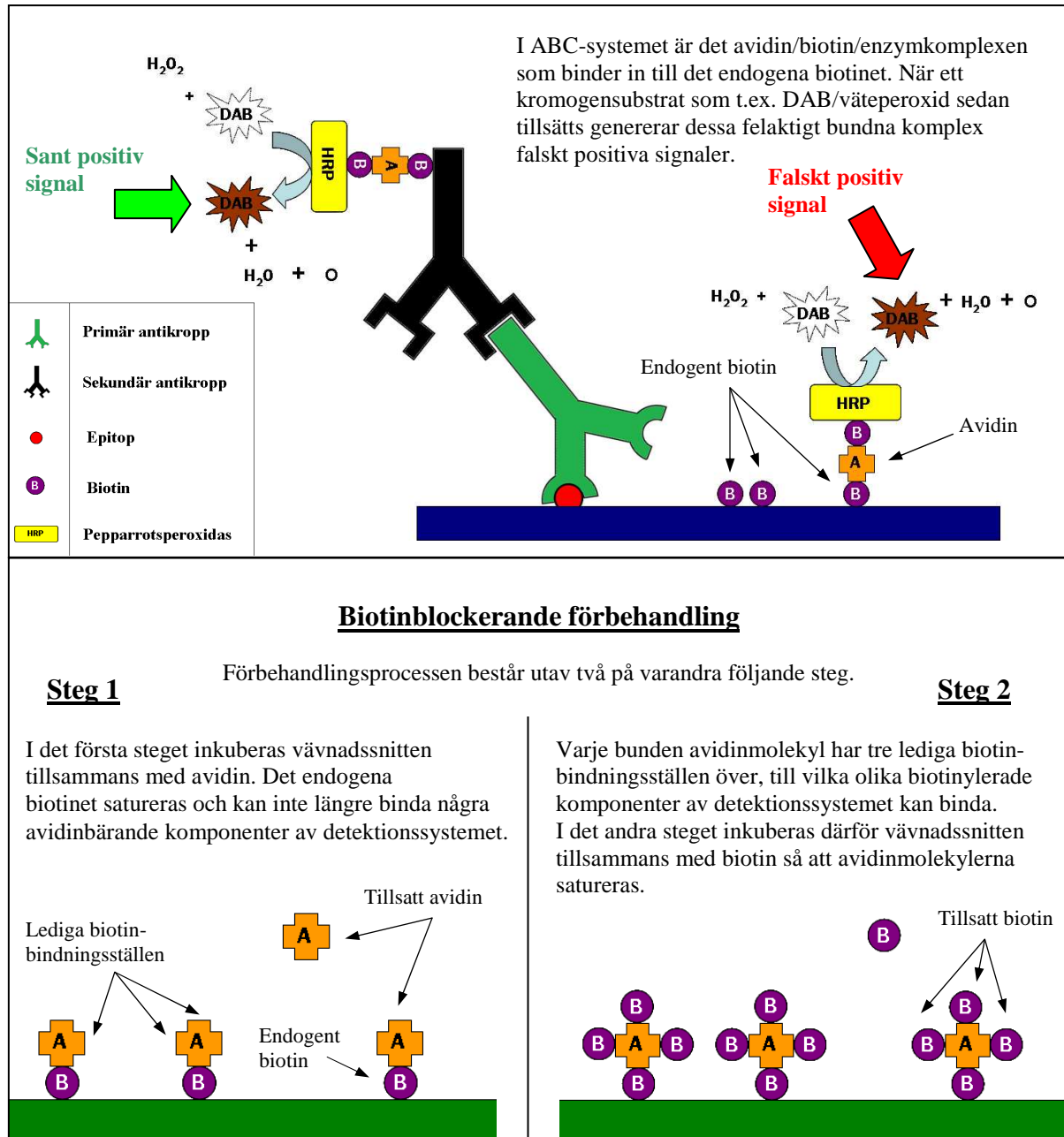
För att, så långt det är möjligt, reversera dessa uppkomna epitopmaskeringar ingår ofta i IHC-protokoll epitopåtervinning (förkortat ER). De två vanligaste ER-metoderna är protease-induced epitope retrieval (PIER) och heat-induced epitope retrieval (HIER). Vid PIER utnyttjas den enzymatiska aktiviteten hos olika enzymer för att demaskera epitop och återställa immunoreaktiviteten medan huvudkonceptet för att åstadkomma detta vid HIER istället är upphettning. Ibland behöver flera olika ER-metoder kombineras för att uppnå ett optimalt resultat. (Renshaw, 2007; Ramos-Vara & Miller, 2014)

HIER kan genomföras på många olika sätt och med olika värmekällor (vattenbad, tryckkokare, mikrovågsugn, ångkokare etc.) men grundprincipen är att vävnadspreparatet hettas upp i en buffert och därefter får svalna av. Natriumcitratbuffert med pH 6.0 är en av de vanligast använda buffertarna men det förekommer även andra buffertar (tris, EDTA etc.) med olika pH (3-10). Det finns ingen buffertlösning som är optimal för alla antigen utan "trial-and-error-metoden" får tillgripas. Den tid som preparatet bör upphettas är omvänt proportionell mot den temperatur som används. För de flesta antigen kan ett bra resultat uppnås genom upphettning till 90-95°C i 20 minuter. Valet av värmekälla har ingen större betydelse för resultatet. (Renshaw, 2007; Ramos-Vara & Miller, 2014)

Blockning av endogen avidin-bindande aktivitet

Biotin är en typ av B-vitamin och påträffas därför naturligt bundet till enzymer och andra proteiner i många av kroppens vävnader. I de fall ett avidin-biotin-kopplat detektionssystem används kan de avidinbärande komponenterna binda till sådant endogent biotin och generera falskt positiva signaler. I Figur 9 illustreras endogen avidin-bindande aktivitet när ett ABC-system används. Om problem med endogent biotin misstänks bör biotinblockerande förbehandling införas i IHC-protokollet; denna illustreras och förklaras i Figur 9. (Taylor & Rudbeck, 2013)

© Oldenburg 2015

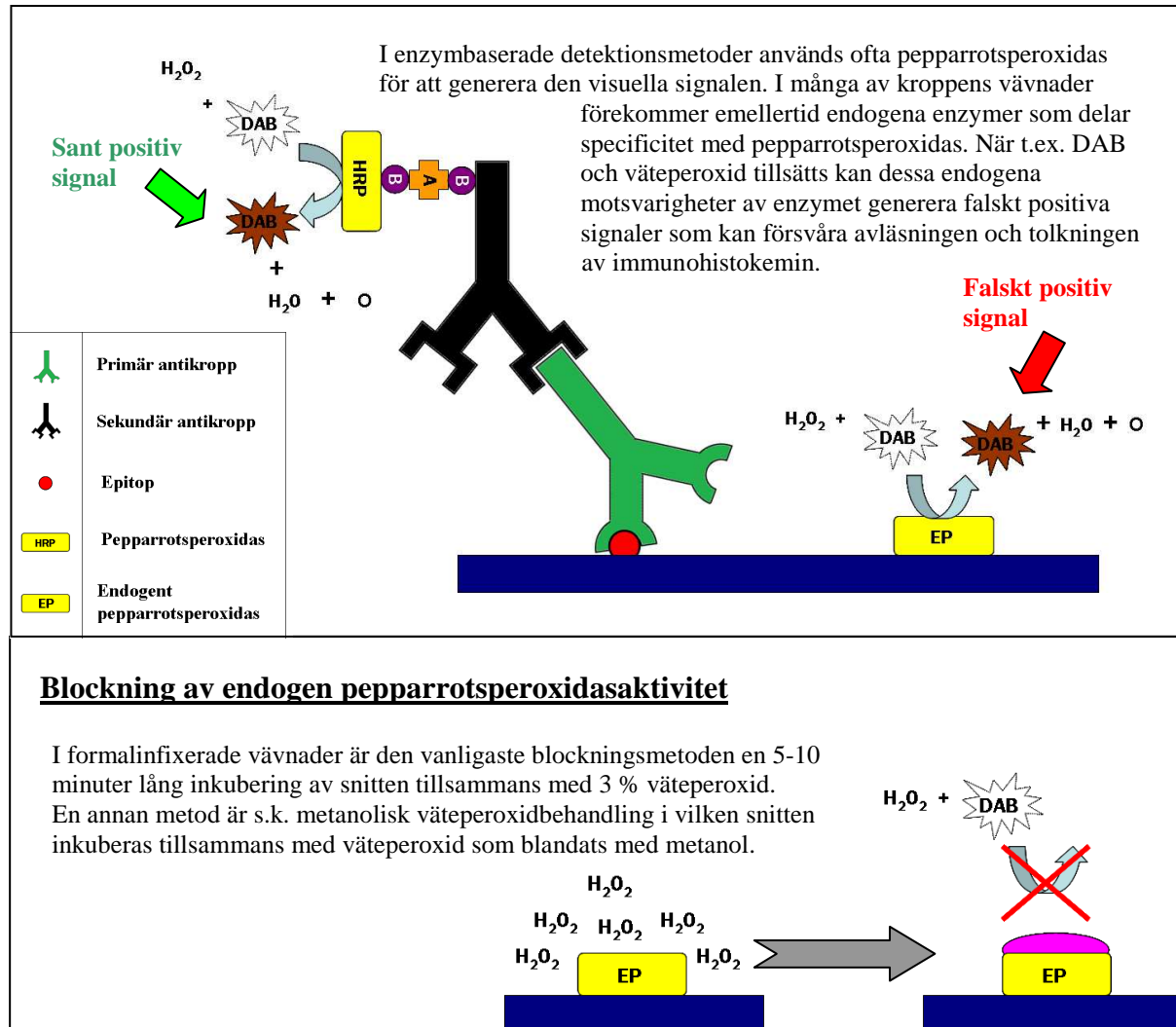


Figur 9. Endogen avidin-bindande aktivitet samt biotinblockerande förbehandling. Ett avidin-biotin immunoperoxidassystem med DAB som kromogen har använts som detektionsmetod.

Blockning av endogen enzymaktivitet

Flera av de enzymer som används i de enzymbaserade detektionsmetoderna har i många vävnader endogent förekommande motsvarigheter som kan generera falskt positiva signaler. I Figur 10 ges ett exempel på en endogen enzymaktivitet och en lämplig blockningsmetod mot denna. (Taylor & Rudbeck, 2013)

© Oldenburg 2015



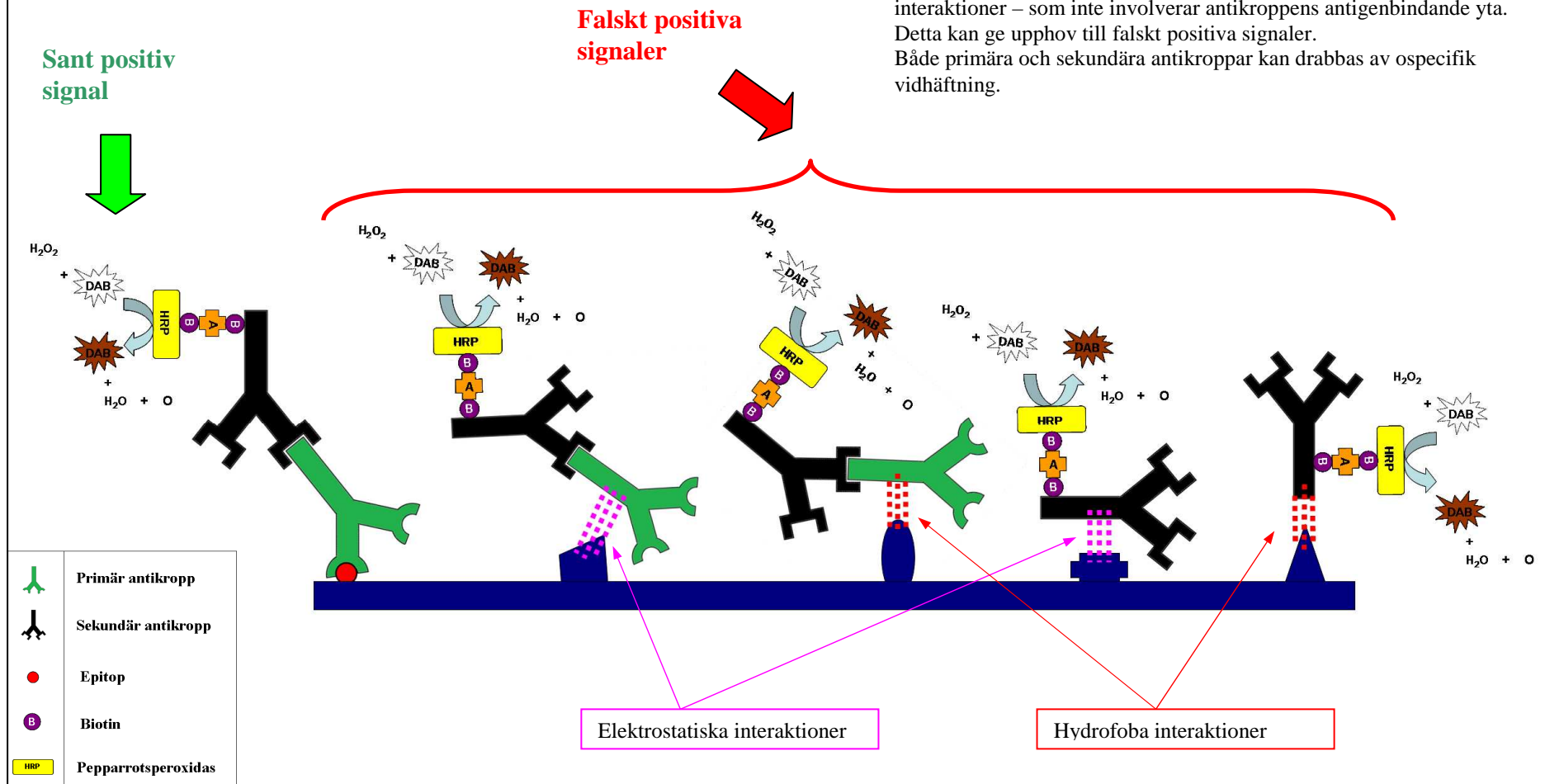
Figur 10. Endogen pepparrotsperoxidasaktivitet och blockning av sådan aktivitet.

Blockning av ospecifik vidhäftning

Bindningen mellan antikroppens antigen-bindande yta och epitopen förmedlas av en blandning av olika icke-kovalenta krafter, bl.a. elektrostatiska och hydrofoba interaktioner. Samma krafter kan även leda till s.k. ospecifik vidhäftning; se Figur 11. Ospecifik vidhäftning är ett vanligt problem vid IHC och i många protokoll förekommer därför någon form av blockning mot sådana interaktioner. En metod för att minska hydrofoba interaktioner är att använda en blockningslösning (se Figur 12) och en metod för att minska elektrostatiska interaktionerna är att öka jonstyrkan i antikropparnas utspädningsbuffert. (Harlow & Lane, 1999; Taylor & Rudbeck, 2013)

Ospecifik vidhäftning

Vid ospecifik vidhäftning "fastnar" antikropparna vid olika strukturer i vävnaden via olika interaktioner – t.ex. hydrofoba och elektrostatiska interaktioner – som inte involverar antikroppens antigenbindande yta. Detta kan ge upphov till falskt positiva signaler. Både primära och sekundära antikroppar kan drabbas av ospecifik vidhäftning.

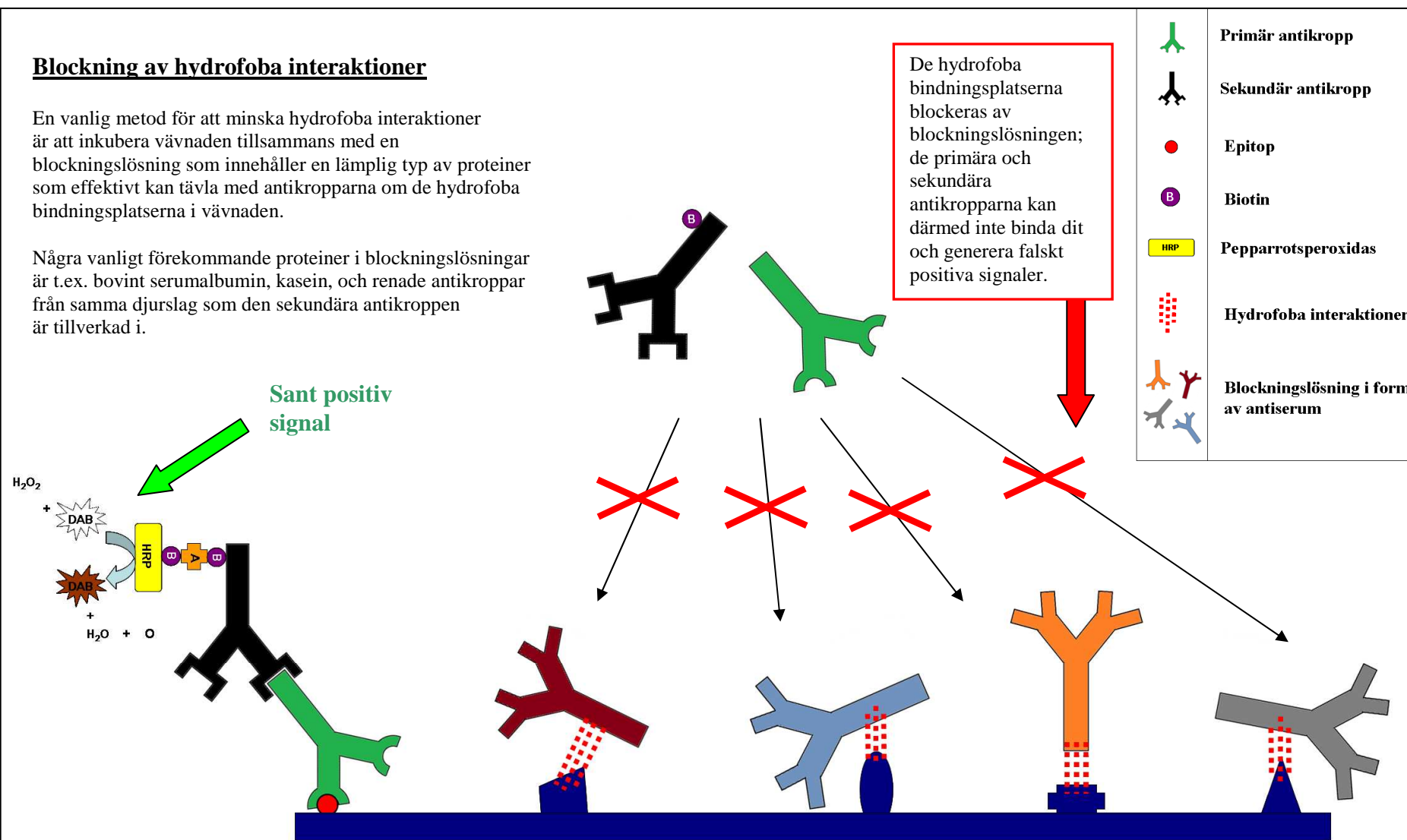


Figur 11. Ospecifik vidhäftning. Ett avidin-biotin immunoperoxidassystem med DAB som kromogen har använts som detektionsmetod.

Blockning av hydrofoba interaktioner

En vanlig metod för att minska hydrofoba interaktioner är att inkubera vävnaden tillsammans med en blockningslösning som innehåller en lämplig typ av proteiner som effektivt kan tävla med antikropparna om de hydrofoba bindningsplatserna i vävnaden.

Några vanligt förekommande proteiner i blockningslösningar är t.ex. bovint serumalbumin, kasein, och renade antikroppar från samma djurslag som den sekundära antikroppen är tillverkad i.



Figur 12. Blockning av hydrofoba interaktioner. Ett avidin-biotin immunoperoxidassystem med DAB som kromogen har använts som detektionsmetod.

GATA-4

GATA-4 är en transkriptionsfaktor som tillhör GATA-familjen. Hos ryggradsdjur har hittills totalt sex stycken GATA-transkriptionsfaktorer identifierats; dessa är evolutionärt mycket välbevarade mellan olika arter (Molkentin, 2000; Patient & McGhee, 2002; Tang *et al.*, 2014). Utifrån strukturell homologi och uttrycksmönster är dessa sex GATA-transkriptionsfaktorer indelade i två subfamiljer (Molkentin, 2000; Tang *et al.*, 2014). I den första subfamiljen ingår GATA-1, -2 och -3, som uttrycks främst i hematopoetiska stamceller (Molkentin, 2000; Tang *et al.*, 2014). Den andra subfamiljen innehåller GATA-4, -5 och -6, som uttrycks i olika vävnader med mesodermalt och endodermalt ursprung som t.ex. hjärta, lever, lunga, tarm, och gonader (Molkentin, 2000; Tang *et al.*, 2014). Denna indelning är inte helt strikt utan en viss överlappning i uttrycksmönster sker mellan subfamiljerna; t.ex. uttrycks GATA-1, förutom i hematopoetiska stamceller, också bl.a. i testiklarnas Sertoliceller (LaVoie, 2003).

Mycket tyder på att GATA-4 spelar många viktiga roller i testikeln hos både prenatala och postnatala djur. Hos prenatala möss har studier visat att GATA-4 krävs för att den sexuella differentieringen och en normal fetal testikelutveckling ska äga rum (Tevosian *et al.*, 2002; Bouma *et al.*, 2007) och postnatalt pekar studier på att GATA-4 bl.a. är en mycket viktig transkriptionsregulator av Sertolicellsfunktionen hos vuxna möss (Kyrönlähti *et al.*, 2011).

Uttrycksmönster i testikeln

I den litteraturstudie som har gjorts i detta arbete har ingen forskning på uttrycksmönster av GATA-4 i testikelvävnaden hos katt kunnat återfinnas men däremot hos mus, människa och gris. Det mesta av forskningen på GATA-4 har gjorts på mus.

Mus

Vid studier på möss används ofta vaginalpluggen som utgångspunkt för den embryologiska tidräkningen och den dag pluggbildning setts brukar betecknas som embryologisk dag 0,5, förkortat E0,5 (Viger *et al.*, 1998; Ketola *et al.*, 1999; Ketola *et al.*, 2002; Anttonen *et al.*, 2003).

Immunohistologiskt har GATA-4-protein detekterats i gonadåsen hos hanmöss så tidigt som E10,5 (Ketola *et al.*, 2002; Anttonen *et al.*, 2003). I gonadåsen hos E11,5-musembryon uttrycks GATA-4-protein i de somatiska cellernas förstadier medan inget uttryck har kunnat detekteras i de primitiva könscellerna (Viger *et al.*, 1998). Hos mus börjar gonadåsen, som är ett könsneutralt förstadium till gonaderna, bli morfologiskt distinkt hos båda könen runt E10,5 och den sexuella differentieringen av gonaderna börjar bli tydlig runt E12 (Raymond *et al.*, 1999). Vid E13,5 har den hanliga gonaden erhållit sitt karakteristiska randiga mönster och Sertoliceller kan tydligt identifieras. Hos de hanliga E13,5-musembryona ses GATA-4-immunoreaktivitet dels i testikelsträngarna i cellkärnorna hos de nyligen differentierade Sertolicellerna (Viger *et al.*, 1998; Ketola *et al.*, 2002; Anttonen *et al.*, 2003; Bielinska *et al.*, 2007) och dels i det interstitiella utrymmet i cellkärnorna hos de fetala Leydigcellerna (Ketola *et al.*, 2002; Bielinska *et al.*, 2007). Uttrycket av GATA-4-protein förblir sedan högt i cellkärnorna hos Sertoliceller (Viger *et al.*, 1998; Ketola *et al.*, 2002; Bielinska *et al.*, 2007).

och Leydigceller (Ketola *et al.*, 2002; Bielinska *et al.*, 2007) under resten av den prenatala testikelutvecklingen. Könscellerna förblir GATA-4-negativa under hela den prenatala testikelutvecklingen (Viger *et al.*, 1998; Ketola *et al.*, 2002; Bielinska *et al.*, 2007).

Under hela musens postnatala testikelutveckling – från den neonatala musen upp till och med den fullvuxna musen – har i tre av fyra studier (Ketola *et al.*, 1999; Ketola *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2004) GATA-4-protein immunohistologiskt tydligt kunnat detekteras i cellkärnorna hos både Sertoliceller och Leydigceller medan det hos könscellerna ej har kunnat påvisas. I den studie vars resultat var avvikande (Viger *et al.*, 1998) kunde GATA-4-immunoreaktivitet endast detekteras i Sertoliceller hos de yngre djuren (1 dag, 7 dagar respektive 14 dagar gamla) och ej hos de pubertala (23 dagar gamla) eller vuxna djuren; hos de pubertala och vuxna djuren sågs istället en GATA-4-immunoreaktivitet hos könscellerna som fram tills dess ej hade uttryckt GATA-4-protein. Ytterligare ett avvikande resultat som sågs i samma studie (Viger *et al.*, 1998) var att de interstitiella cellerna förblev GATA-4-immunonegativa under hela den postnatala testikelutvecklingen.

Immunohistokemisk detektion av proteinprodukt är bara ett av de sätt som genuttryck kan studeras på. Ett annat sätt är detektion av genens mRNA. Prenatalt har GATA-4-mRNA detekterats i gonadåsen hos hanmöss så tidigt som E10,5 och med hjälp av In situ-hybridisering har uttrycket av GATA-4-mRNA i testiklarna hos hanliga E13,5-embryon kunnat lokaliseras till både testikelsträngsceller, som troligtvis är Sertoliceller, och till interstitiella celler, som troligtvis är Leydigceller (Ketola *et al.*, 1999; Bielinska *et al.*, 2007). I både de interstitiella cellerna och testikelsträngscellerna förblir förekomsten av GATA-4-mRNA riklig även i den sena fetala (E19) testikeln (Ketola *et al.*, 1999).

Postnatalt ses GATA-4-mRNA i testikelvävnaden hos möss under hela den postnatala testikelutvecklingen, från den neonatala musen upp till och med den fullvuxna musen (Ketola *et al.*, 1999; Anttonen *et al.*, 2003).

För att med hjälp av Northern Blot Analys fastställa i vilka cellinjer i den postnatala mustestikeln som GATA-4-mRNA uttrycks, fraktionerades i en studie (Imai *et al.*, 2004) testiklarna från vuxna respektive 14 dagar gamla möss upp i olika celltypsfraktioner: Sertoliceller, Leydigceller och könsceller. I testiklarna från de vuxna mössen delades även könscellernas olika utvecklingsstadier upp i tre olika fraktioner – spermatocyter, runda spermatider och elongerade spermatider – som testades var och en för sig. GATA-4-mRNA detekterades i både Sertolicellsfraktionen och Leydigcellsfraktionen från samtliga djur medan ingen detektion av GATA-4-mRNA gjordes i någon av de olika könscellsfraktionerna från något av djuren. I en annan studie (Ketola *et al.*, 1999) där istället In situ-hybridisering användes sågs överrensstämmande resultat; i denna studie påvisades hos både den neonatala (4 dagar) och den vuxna (90 dagar) musen GATA-4-mRNA i både Sertoli- och Leydigceller medan könscellerna var negativa.

Att testikelkoncentrationen av GATA-4-mRNA i studier har visat sig minska under den postnatala testikelutvecklingen (Viger *et al.*, 1998; Ketola *et al.*, 1999) har antagits bero på att förhållandet mellan Sertoliceller och könsceller under testikelutvecklingen förskjuts från Sertolicellsdominans till könscellsdominans; GATA-4-uttrycket från de positiva Sertolicellerna ”späds” därmed ut av de negativa könscellerna vilket resulterar i att GATA-4-uttrycket ser ut att minska under den postnatala testikelutvecklingen (Ketola *et al.*, 1999; Imai *et al.*, 2004). För att verifiera detta antagande mättes i en studie (Imai *et al.*, 2004) testikelkoncentrationen av GATA-4-mRNA hos dels normala möss och dels sex stycken olika typer av genmodifierade, könscells fria möss vars testiklar innehöll få eller inga könsceller. Om antagandet var riktigt förväntades den detekterade testikelkoncentrationen av GATA-4-mRNA i försöket vara högre hos samtliga typer av könscells fria möss än hos de normala mössen. Försöket utföll med det förväntade resultatet vilket talar för att antagandet är riktigt och att uttrycket av GATA-4 i testikeln somatiska celler alltså bibehålls på en konstant nivå under den postnatala testikelutvecklingen (Imai *et al.*, 2004).

Gris

I en studie på gris (McCoard *et al.*, 2001) utfördes immunohistokemi med GATA-4-antikroppar på testikelvävnad från en rad fetala (ålder: 30-40 och 105 dagar postcoitus), prepubertala (ålder: 1, 14 och 56 dagar postpartum) och postpubertala (ålder: 240 och 420 dagar postpartum) djur. Hos samtliga djur i alla de testade åldrarna sågs ett starkt uttryck av GATA-4 i samtliga Sertolicellkärnor i de histologiska snitten. Hos samtliga testade åldrar kunde också ett mycket svagare uttryck av GATA-4 observeras i cellkärnorna hos Leydigcellerna och i vissa peritubulära celler. Inte hos något av de testade djuren kunde ett uttryck av GATA-4 ses i cellkärnorna hos könscellerna, oavsett vilket utvecklingsstadium dessa befann sig i (McCoard *et al.*, 2001).

Människa

I en studie på människa (Ketola *et al.*, 2000) undersöktes uttrycksmönstret för GATA-4 i testikelvävnad från en rad fetala (12-40 veckor gamla), prepubertala (1-7 år gamla), pubertala (15 år gammal) samt vuxna individer (62-86 år gamla). I denna studie kunde GATA-4-protein immunohistokemiskt detekteras i den fetala testikeln så tidigt som graviditetsvecka 12 då ett positivt uttryck av GATA-4-protein kunde ses i både Sertoliceller, könsceller och Leydigcellsprekursorer. Dessa tre celltyper förblev sedan GATA-4-positiva under resten av graviditeten; vissa av spermatogonierna var dock GATA-4-negativa. Under hela fosterutvecklingen var GATA-4-immunoreaktiviteten starkare i Sertolicellerna och könscellerna än i Leydigcellerna. I de postnatala individerna i samma studie (Ketola *et al.*, 2000) skilde sig uttrycksmönstret för GATA-4 mellan de prepubertala och de pubertala/postpubertala individerna. I testiklarna hos de prepubertala individerna sågs ett starkt uttryck av GATA-4-protein i cellkärnorna hos både Sertoliceller och spermatogonier (vissa spermatogonier var dock negativa) medan bara en svag GATA-4-positiv färgning kunde ses i ett fåtal Leydigceller. Under puberteten ökade GATA-4-immunoreaktiviteten i Leydigcellerna och denna ökade immunoreaktivitet kvarstod sedan även hos de vuxna individerna; med stigande ålder minskade dock antalet positiva Leydigceller. Hos både de pubertala och de vuxna individerna sågs också ett positivt uttryck av GATA-4-protein i Sertolicellerna medan alla typer av könsceller var helt GATA-4-negativa.

I samma studie (Ketola *et al.*, 2000) undersöktes även med hjälp av Northern Blot Analys förekomsten av GATA-4-mRNA. Prenatalt detekterades GATA-4-mRNA i den fetala testikeln hos hanliga foster så tidigt som graviditetsvecka 15 och en fortsatt förekomst av GATA-4-mRNA sågs sedan i testiklarna upp till och med vuxen ålder.

Användningsområden inom immunohistokemin

Utöver sin givna roll i forskning om GATA-4 har immunohistokemi med GATA-4-antikroppar även använts i GATA-4-orelaterade studier (Southwood *et al.*, 2012; Gassei & Orwig, 2013; Hussain *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2014), då för färgning av Sertolicellkärnor. GATA-4 har av flera olika anledningar visat sig vara en bra immunohistokemisk markör för Sertoliceller. För det första har ett positivt uttryck av GATA-4 – hos både mus (Ketola *et al.*, 1999; Ketola *et al.*, 2002; Anttonen *et al.*, 2003; Imai *et al.*, 2004; Bielinska *et al.*, 2007), gris (McCoard *et al.*, 2001) och människa (Ketola *et al.*, 2000) – immunohistokemiskt kunnat påvisas i Sertolicellkärnor under hela den prenatala och postnatala testikelutvecklingen samt i testiklarna hos den vuxna individen. För det andra har uttrycket av GATA-4 visat sig ligga på en jämn, stabil nivå som ej varierar med de olika stadierna av den spermatogenetiska cykeln (Ketola *et al.*, 1999; Ketola *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2004).

I en studie (McClusky *et al.*, 2009) på råttor upptäcktes av en slump ytterligare ett potentiellt användningsområde för GATA-4-immunohistokemi. När McClusky *et al.* (2009) använde GATA-4 som markör för Sertoliceller upptäckte de att en viss typ av GATA-4-antikropp (polyklonal get antimus GATA-4-antikropp, C-20, sc-1237, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) tydligt färgade akrosomen under hela spermiogenesen, något som McClusky *et al.* (2009) visade kan vara till hjälp vid stadiindelning av den spermatogenetiska cykeln. Ett identiskt resultat erhöles även när McClusky *et al.* (2009) upprepade försöket med en ny batch av samma antikropp från samma tillverkare. När en annan typ av GATA-4-antikropp (monoklonal mus antihuman GATA-4-antikropp, G-4, sc-25310, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) användes sågs däremot ingen akrosomfärgning utan bara en färgning av Sertoliceller och Leydigceller (McClusky *et al.*, 2009).

Den polyklonala GATA-4 antikroppen C-20 (sc-1237, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) har även i flera andra studier på andra djurslag (Ketola *et al.*, 2002; Owston & Ramos-Vara, 2007; Ramos-Vara & Miller, 2009; Kyrölähti *et al.*, 2011; Southwood *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2013) givit upphov till en tydlig perinukleär färgning i spermatiderna. Mönstret på den perinukleära färgningen i dessa studier har, i de fall bra bilder funnits, liknat den akrosomfärgning som McClusky *et al.* (2009) erhöles och flera av författarna har också, precis som McClusky *et al.* (2009), dragit slutsatsen att det rör sig om en färgning av akrosomen.

MATERIAL OCH METODER

Material

Testiklar från 46 privatägda hankatter av olika raser och med en ålder på mellan 2,5 månader och 5 år ingick i denna studie. Testiklarna insamlades från olika veterinärkliniker i Uppsala under februari-maj 2014 i samband med att katterna genomgick rutinmässig normalkastration. De enda urvalskriterierna för att få ingå i studien var att katterna hade kommit till kliniken för normalkastration och att de ej var kryptorkida. Efter kastrationen förvarades testiklarna i kylskåp och transporterades därefter i kyllåda (4°C) direkt till laboratoriet. Testiklarna fixerades löpande vartefter som de samlades in. Tiden från kastrering till fixering varierade från mindre än 1 timme till 48 timmar, men för ca 90 % av katterna gjordes fixeringen inom 24 timmar. Höger eller vänster testikel valdes slumpmässigt från varje katt för preparering. I denna rapport presenteras katterna kodade (K1-K46).

Metoder

Två olika försök utfördes enligt beskrivning nedan. Båda försöken genomfördes blint såtillvida att undersökaren saknade tillgång till data (t.ex. ålder) om katterna tills efter det att allt laboratoriearbete och all mikroskoperingsbedömning av de histologiska snitten hade avslutats.

Bedömning av celler i spermatogenesen

För varje individ iordningställdes två hematoxylineosinfärgade, paraffinbäddade (4 µm) histologiska snitt. Det ena snittet fixerades 24 timmar i Bouins fixeringslösning (71 % pikrinsyra, 24 % formalin, 5 % ättiksyra) och det andra fixerades 24 timmar i modifierad Davidsons fixeringslösning (30 % formalin, 15 % etanol, 5 % isättika, 50 % destillerat vatten). Spermieförekomst undersöktes för samtliga 46 katter. Hos de katter där inga färdiga spermier hittades gjordes en bedömning av vilket det högst utvecklade könscellsstadiet i så fall var, d.v.s. spermatogonium, spermatocyt, rund spermatid eller elongerad spermatid. Snitten undersöktes med hjälp av ljusmikroskop (Olympus BH-2, Olympus Corporation, Tokyo, Japan, och Leica DMLS, Leica Microsystems, Wetzlar, Tyskland; samtliga preparat undersöktes med båda mikroskoperna) med 100, 200, 400 och 1000 gångers förstoring.

Immunohistokemi med GATA-4

Den immunohistokemiska undersökningen gjordes på 21 av katterna. Den utfördes på paraffinbäddade (4 µm) histologiska snitt som fixerats 24 timmar i modifierad Davidsons fixeringslösning och monterats på SuperFrostTM Plus mikroskopglas (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Som primär antikropp användes GATA-4 C-20 (sc-1237, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) och som detektionsmetod användes ett avidin-biotin immunoperoxidassystem med DAB som kromogen (ImmunoCruzTM goat ABC Staining System, sc-2023, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA). Som negativ kontroll användes dels normal get-IgG (sc-2028, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) och dels PBS. Totalt har fyra olika protokollversioner använts. Ursprungsprotokollet kan ses i Tabell 1 och en sammanställning över vilka katter som användes samt vilka modifieringar som gjordes av ursprungsprotokollet kan ses i Tabell 2.

Snitten undersöktes med hjälp av ljusmikroskop (Olympus BH-2, Olympus Corporation, Tokyo, Japan, och Leica DMLS, Leica Microsystems, Wetzlar, Tyskland; samtliga preparat undersöktes med båda mikroskopen) med 100, 200, 400 och 1000 gångers förstoring.

De histologiska bilderna som presenteras i Figurerna 14-18 är fotograferade med Nikon Eclipse 80i (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) och programmet NIS-Elements F 2.30.

Tabell 1. Grundprotokoll som användes för immunohistokemi med GATA-4

Dag 1	
Steg	
1	Avparaffinera i xylene i 3x5 min.
2	Rehydrera i graderad etanolserie med minskande koncentrationer (absolut, 95 % och 70 %). 2x30 sek. i varje koncentration.
3	Skölj i kranvatten x 3 och låt sedan stå i kranvatten i 5 min.
4	Epitopåtervinning genom kokning i 0,01 M natriumcitratbuffert (pH 6,0) i 20 min på kokplatta.
5	Skölj i kranvatten x 3 och låt sedan stå i kranvatten i 10 min.
6	Neutralisering av endogen peroxidasaktivitet genom inkubering i 3 % väteperoxid i metanol i 10 min (mörkt).
7	Skölj i PBS x 3.
8	Tillsätt blockningsserum (1,5 % normalt åsnaserum i PBS). Inkubera 30 min (mörkt) i fuktkammare.
9	Låt överskottsserum rinna av.
10	Tillsätt primär antikropp GATA-4 (spädd 1:50 i PBS) till de glas som ska ha den primära antikroppen. I de negativa kontrollerna ersätts den primära antikroppen med normal get-IgG (sc-2028, spädd 1:100 i PBS). Inkubera mörkt i 4°C i fuktkammare över natten (ca 17 h).
Dag 2	
11	Skölj i PBS x 3 (negativa kontrollglas sköljs i egen kyvett).
12	Tillsätt sekundär antikropp (spädd 1:200 i PBS). Inkubera 30 min i fuktkammare.
13	Skölj i PBS x 3.
14	Blanda AB-enzymreagens enligt kitets medföljande anvisningar. Tillsätt till glasen och inkubera 30 min i fuktkammare.
15	Skölj i PBS.
16	Blanda DAB/oxidassubstrat enligt kitets medföljande anvisningar. Tillsätt till glasen och inkubera 10 min (mörkt) i fuktkammare.
17	Skölj i destillerat vatten.
18	Färga med Hematoxylin i 5-8 min.
19	Skölj i rinnande kranvatten i 15 min.
20	Montera på täckglas med Kaiser's Glycergel (glycerolgelatin).

Tabell 2. *Sammanfattning av vilka immunohistokemiska protokollversioner som användes till vilka katter, samt vilka förändringar som gjordes av ursprungsprotokollet (se Tabell 1) för de olika versionerna*

Ursprungsprotokollet

Katter: K36, K42 och K45.

Protokoll version 2

Protokollförändringar:

- Ingen motfärgning med hematoxylin gjordes, d.v.s. steg 18 och 19 i ursprungsprotokollet ströks.

Katter: K3, K6, K40, K45, K46.

Protokoll version 3

Protokollförändringar:

- Koncentrationen av blockningsserumet (steg 8) höjdes till 3 %.
- Inkuberingstiden för DAB/oxidassubstratet (steg 16) sänktes till 3,5 min.
- I steg 17 ökades sköljningen i destillerat vatten från 1 gång till 3 gånger.
- Motfärgning gjordes med hematoxylin (steg 18) men färgningstiden sänktes till 8-10 sek.

Katter:

- Omgång 1: K36, K42, K45.
- Omgång 2: K13, K20, K21, K37, K41, K44.
- Omgång 3: K9, K23, K24, K32, K33, K39.
- Omgång 4: K3, K6, K7, K12, K21, K37.

Protokoll version 4

Protokollförändringar

- Samma förändringar som gjordes för protokoll version 3.
- En negativ kontroll lades till så att varje katt hade två olika negativa kontroller, en med normal get-IgG och en med PBS.

Katter:

- Omgång 1: K6, K20, K44.
 - Omgång 2: K3, K7, K45.
-

RESULTAT

Bedömning av celler i spermatogenesisen

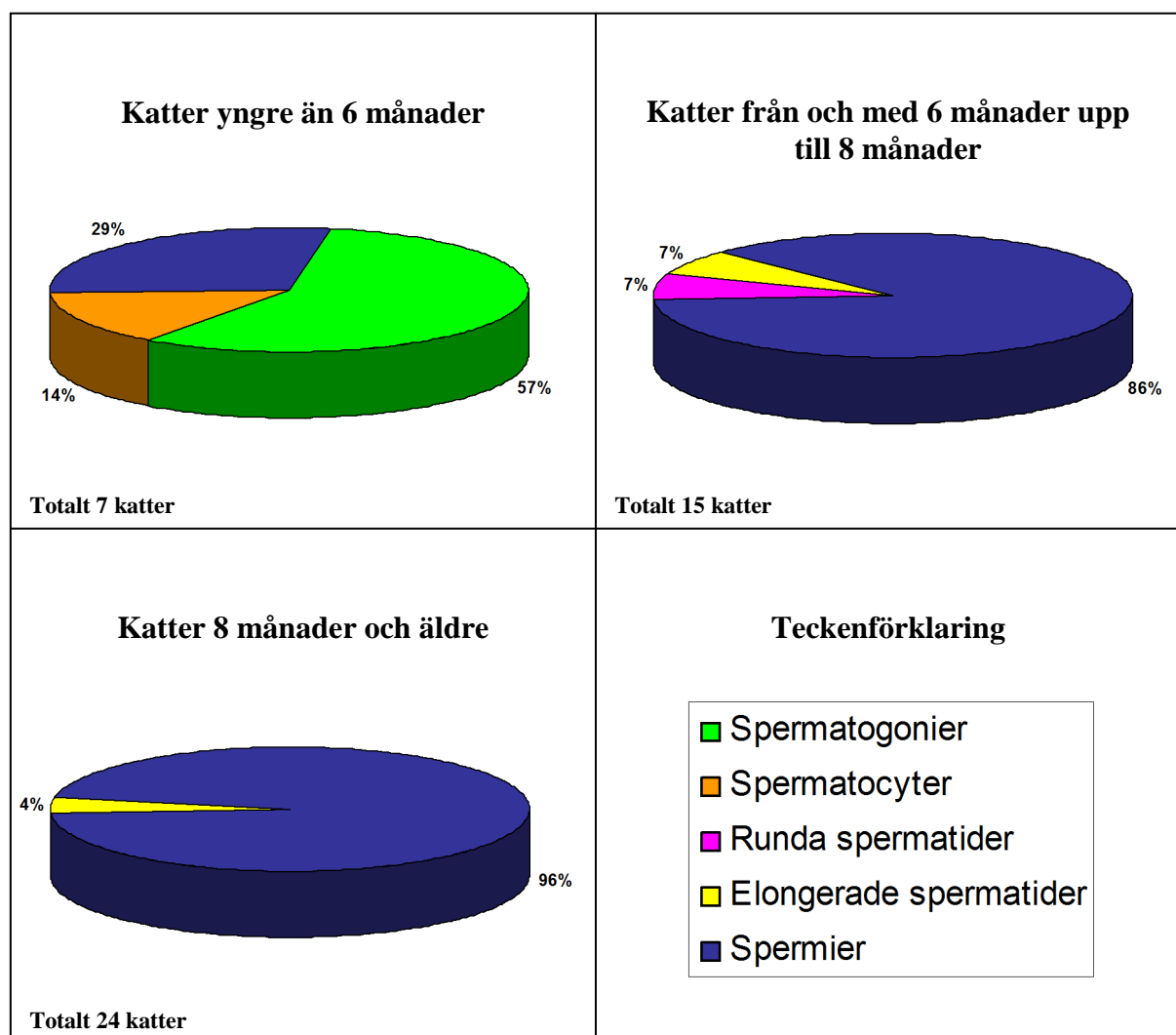
I Tabell 3 presenteras resultaten för varje individ. I Tabell 4 och Figur 13 ges en sammanställning över resultatet för olika ålderskategorier.

Tabell 3. Redovisning av vilket det högst utvecklade könscellsstadiet var hos de olika katterna

Katt	Ålder (månader)	Utvecklingsstadium
K1	2,5	Spermatocyter
K2	3	Spermatogonier
K3	4,5	Spermatogonier
K4	5	Spermier
K5	5	Spermier
K6	5,5	Spermatogonier
K7	5,5	Spermatogonier
K8	6	Spermier
K9	6	Spermier
K10	6	Spermier
K11	6	Spermier
K12	6	Spermier
K13	6	Spermier
K14	6,5	Spermier
K15	7	Spermier
K16	7	Spermier
K17	7	Spermier
K18	7	Elongerade spermatider
K19	7	Spermier
K20	7	Runda spermatider
K21	7	Spermier
K22	7	Spermier
K23	8	Spermier
K24	8	Spermier
K25	9	Spermier
K26	9	Spermier
K27	10	Spermier
K28	10	Spermier
K29	10	Spermier
K30	10	Spermier
K31	10	Spermier
K32	10	Spermier
K33	11	Spermier
K34	11	Spermier
K35	12	Spermier
K36	12	Spermier
K37	12	Spermier
K38	12	Spermier
K39	12	Spermier
K40	12	Spermier
K41	13	Spermier
K42	18	Spermier
K43	30	Spermier
K44	33	Elongerade spermatider
K45	36	Spermier
K46	60	Spermier

Tabell 4. Andel katter, i 5 olika ålderskategorier, som uppvisade spermieförekomst

Ålderskategori (månader)	Antal undersökta katter	Positiv spermieförekomst	
		Antal katter	Procent
Under 5	3	0	0 %
5 – 5,5	4	2	50 %
6 – 6,5	7	7	100 %
7	8	6	75 %
8 – 60	24	23	96 %



Figur 13. Andel katter, i tre olika ålderskategorier, som hade spermatogonier, spermatocyter, runda spermatider, elongerade spermatider respektive färdiga spermier som sitt högst utvecklade könscellsstadium.

Immunohistokemi med GATA-4

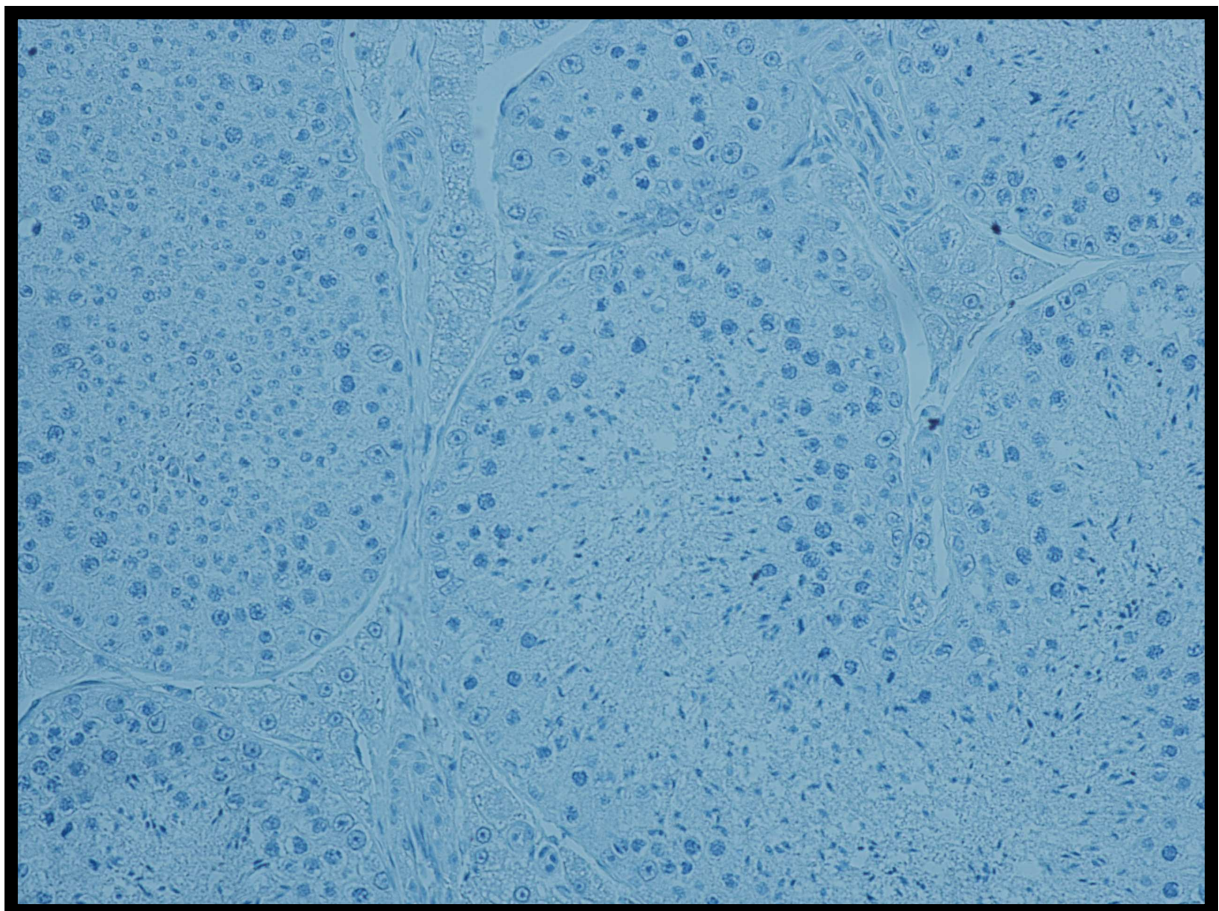
Ursprungsprotokollet och protokoll version 2

Preparaten som färgades enligt ursprungsprotokollet blev starkt överfärgade med hematoxylin vilket gjorde det svårt att urskilja den bruna färgen från immunohistokemin.

I protokoll version 2 togs motfärgningen med hematoxylin bort. I dessa preparat kunde den bruna färgen från immunohistokemin tydligt urskiljas, men då cellerna och vävnaden i övrigt var nästan helt osynliga var det mycket svårt att se exakt vilka strukturer det var som hade blivit positivt färgade. De negativa kontrollerna i protokoll version 2 var inte negativa.

Protokoll version 3 och 4

I protokoll version 3 och 4 var motfärgningen med hematoxylin lagom stark men de negativa kontrollerna som fått normal get-IgG istället för den primära antikroppen var fortfarande inte negativa trots de protokollförändringar som gjorts för att åtgärda detta. De negativa kontroller som fått PBS istället för den primära antikroppen var däremot helt negativa (protokoll version 4); se Figur 14.

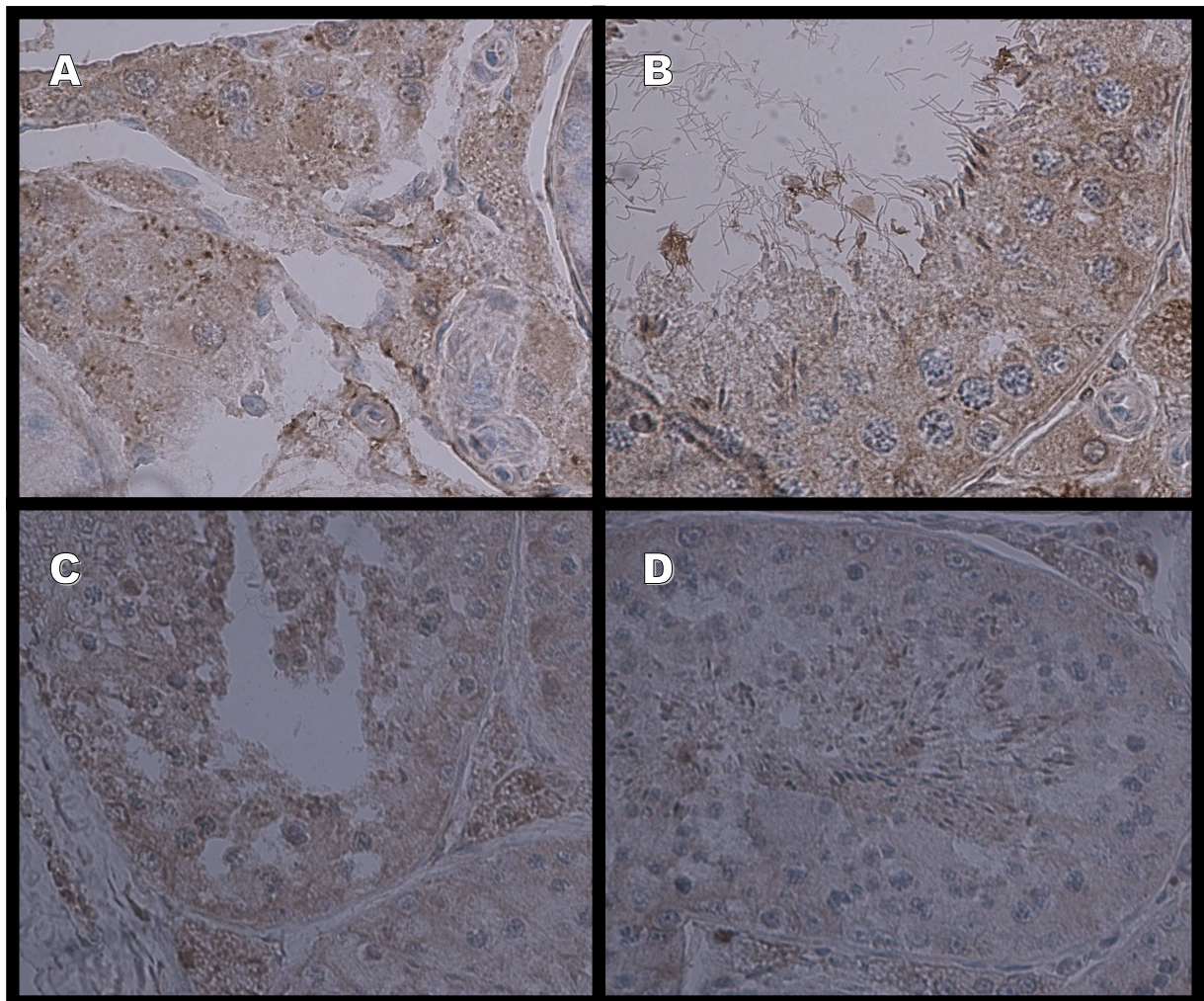


Figur 14. De negativa kontroller som fått PBS istället för den primära antikroppen var helt negativa.

Bakgrundsfärgning

Bakgrundsfärgning definieras som en oväntad eller icke önskvärd färgning som inte representerar målantigenet och som ses i vävnaden på antingen test- eller kontrollglasen (Harlow & Lane, 1999).

I både GATA-4-glasen och de negativa kontroller som fått normal get-IgG sågs ett genomgående problem med bakgrundsfärgning. Bakgrundsfärgningen tycktes inte vara knuten till någon särskild celltyp eller vävnadsstruktur utan sågs mer slumpmässigt på olika ställen i både den interstitiella avdelningen och sädeskanalerna. Både styrkan och lokalisation på bakgrundsfärgningen samt dess mängd och utbredning varierade dels inom och dels mellan de olika preparaten. När GATA-4-glasen och de negativa kontrollerna jämfördes med varandra sågs inget mönster i vilket glas som hade mest bakgrundsfärgning utan det varierade från katt till katt. I Figur 15 ses några exempel från både GATA-4-glasen och de negativa kontrollerna (get-IgG) på områden med relativt kraftig bakgrundsfärgning.

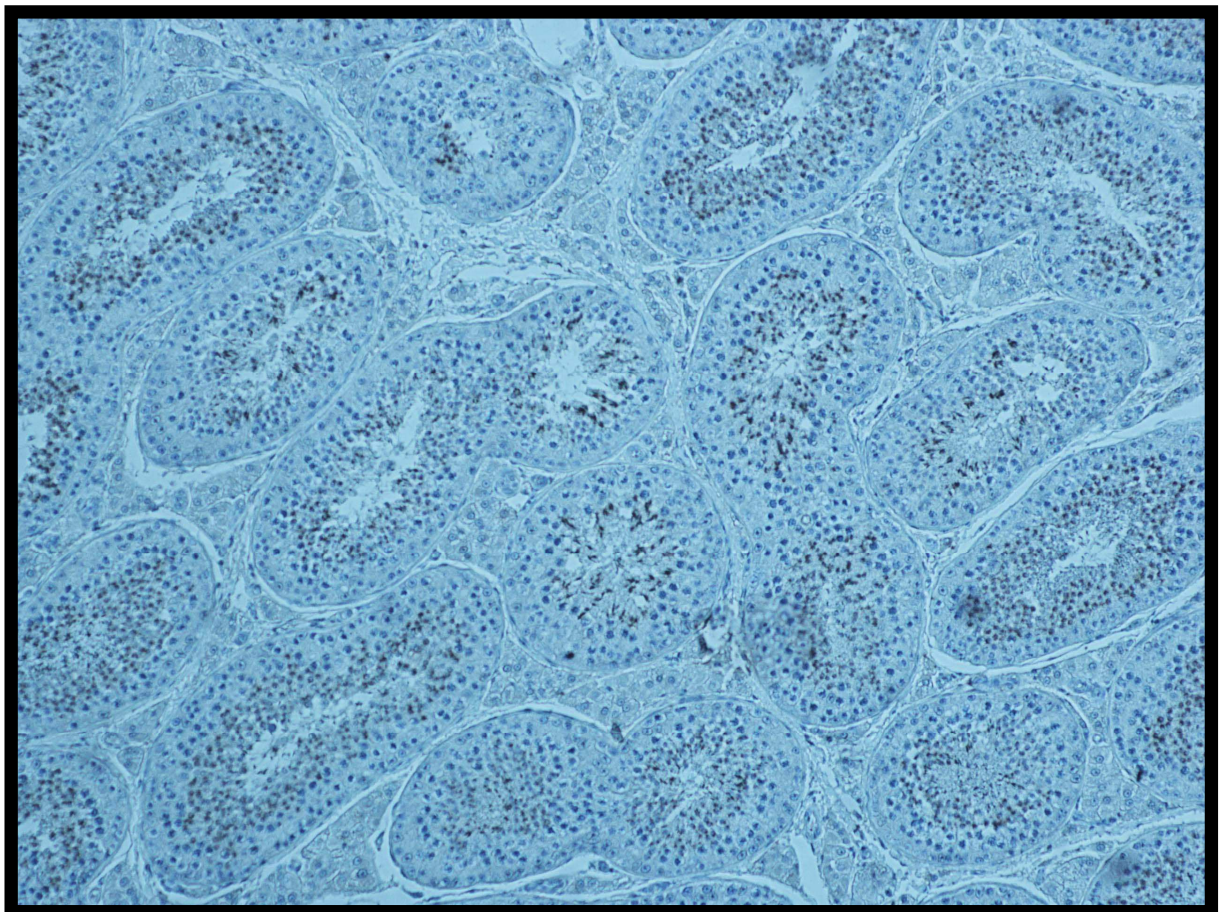


Figur 15. *Bakgrundsfärgning. A-B är från GATA-4-glas och C-D är från negativ kontroll (get-IgG).*

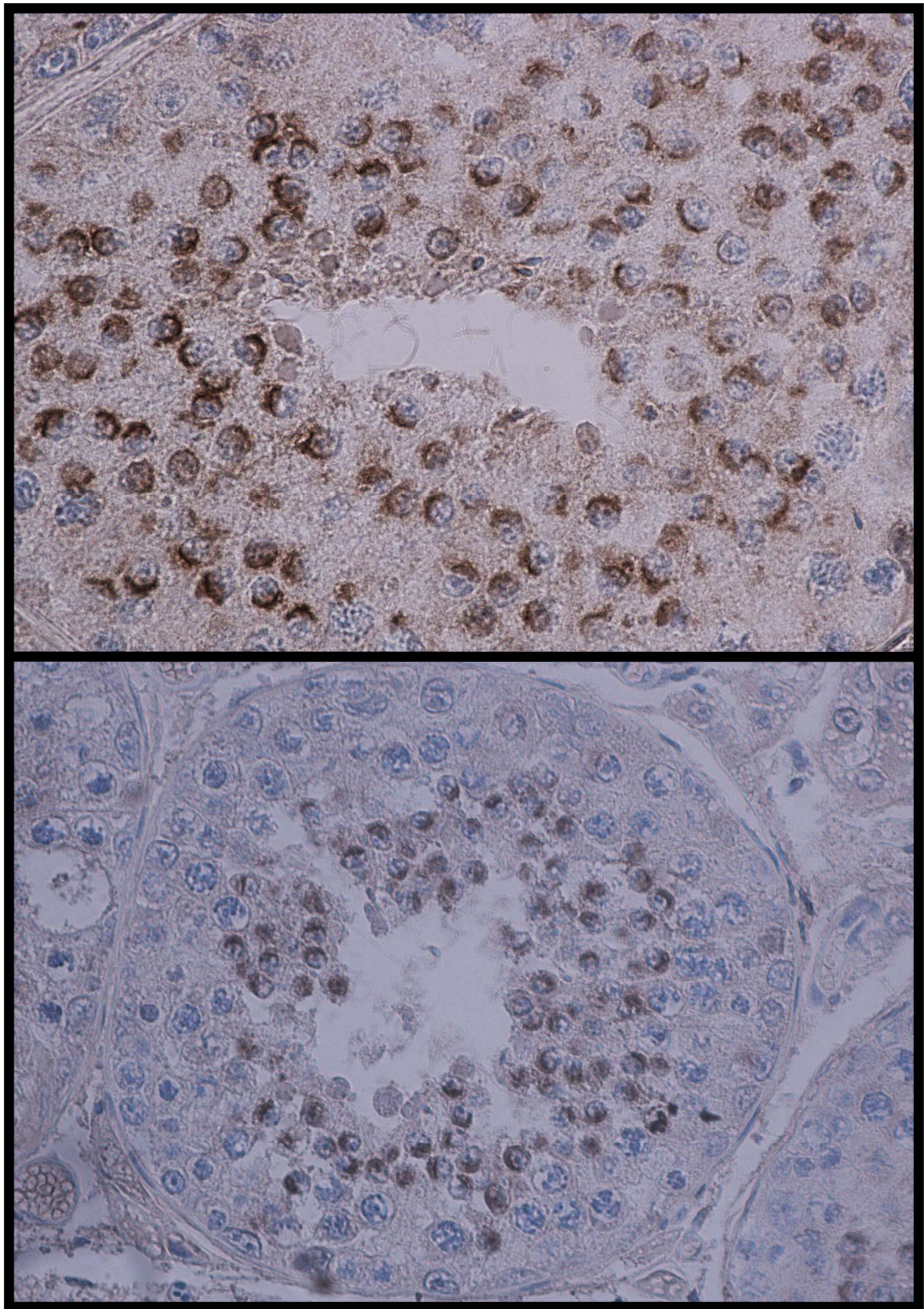
Könsceller

Hos samtliga katter med spermatider sågs i GATA-4-glasen, men inte i någon av de negativa kontrollerna, en positiv reaktion i spermatiderna; se Figur 16. I de elongerade spermatiderna såg större delen av huvudet positivt ut. I de runda spermatiderna var den positiva färgningen istället begränsad till ett perinukleärt område av varierande storlek och form, allt ifrån en liten rund prick i vissa spermatider upp till en lite större tunn halvmåne i andra; se Figur 17. Hos samtliga katter varierade styrkan på den positiva reaktionen i de runda och elongerade spermatiderna mycket mellan olika områden; i vissa delar av preparaten var den mycket kraftig med en nästan brunsvart färg medan den i andra delar av preparaten var knappt synbar. Förutom variation inom preparaten sågs också en variation mellan preparaten; i vissa katter var den positiva reaktionen i spermatiderna kraftig i majoriteten av preparatet medan den i andra katter var kraftig i endast en liten del av preparatet och svag i resten.

De övriga typerna av könsceller – spermatogonier, spermatocyter och spermier – var antingen negativa eller, på de ställen där bakgrundsfärgning sågs, inte märkbart mer positiva än den omgivande vävnaden.



Figur 16. *Positiv färgning av spermatider i GATA-4-glas.*



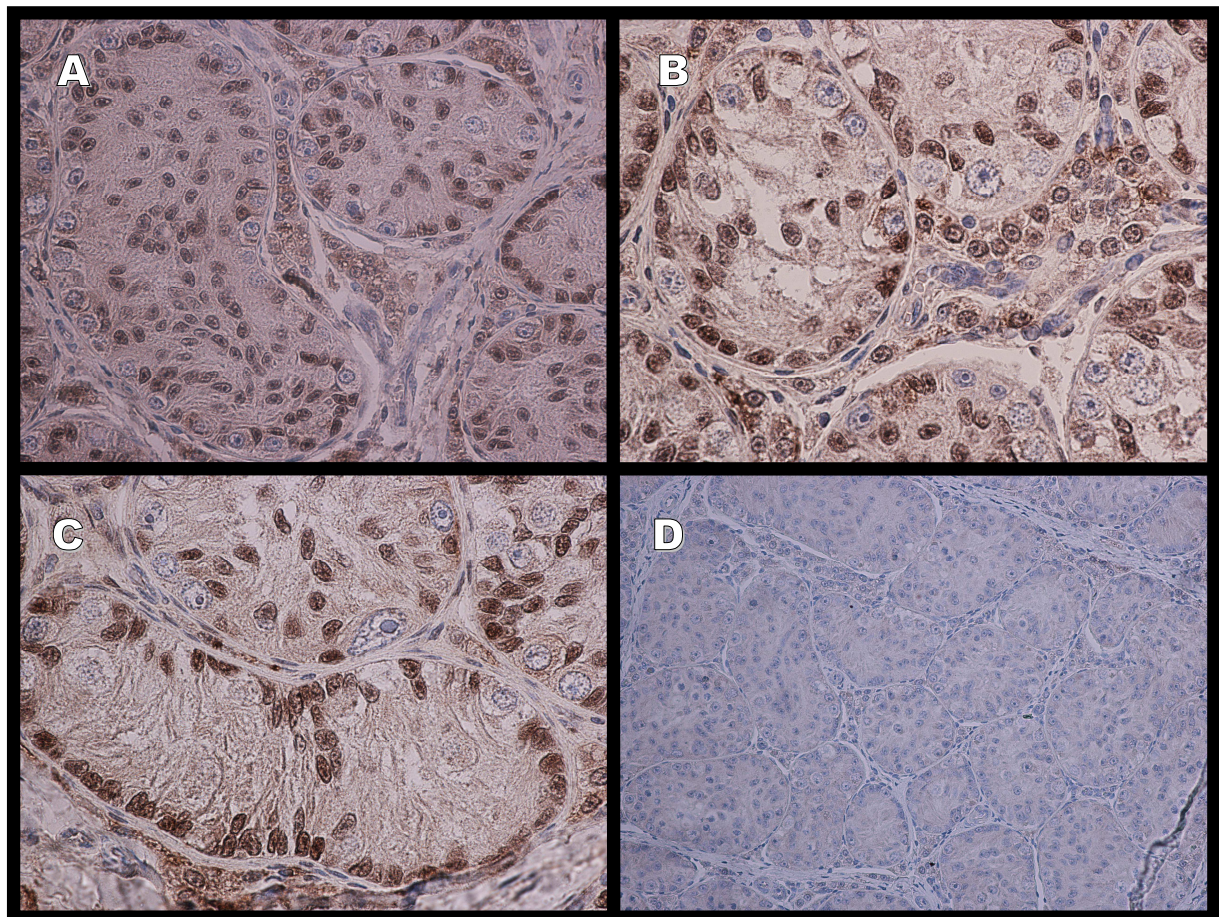
Figur 17. Perinukleär färgning i de runda spermatiderna i GATA-4-glasen.

Sertoliceller och Leydigceller

Hos alla katter utom en (K3) var de Sertoliceller som sågs antingen negativa eller inte märkbart mer positiva än bakgrundsfärgningen i den omgivande vävnaden. Detsamma gällde för de allra flesta Leydigceller; till skillnad från Sertolicellerna hittades emellertid några enstaka Leydigceller som såg mer positiva ut än den omgivande vävnaden.

Katt med avvikande resultat

En katt (K3) hade ett resultat som var tydligt avvikande från de övriga katternas. I GATA-4-glasen hos K3 sågs i de flesta Sertoliceller en starkt positiv nukleär färgning. De flesta Leydigceller var också positiva men immunoreaktiviteten i dem var inte lika nukleär och oftast inte heller lika stark som den i Sertolicellerna. I de negativa kontrollerna sågs inga positiva Sertoliceller eller Leydigceller. I Figur 18 ses bilder från GATA-4-glasen och, för jämförelse, den negativa kontrollen (get-IgG).



Figur 18. Resultat för katten K3. A-C är från GATA-4-glasen: positiva Sertoli- och Leydigceller och negativa spermatogonier. D är från den negativa kontrollen (get-IgG): negativa Sertoliceller, Leydigceller och spermatogonier.

DISKUSSION

Bedömning av celler i spermatogenesisen

Spermieförekomsten har i denna studie endast undersökts kvalitativt och inte kvantitativt. I resultattabellen görs därför inte någon skillnad mellan de katter som endast hade ett fåtal spermier och de katter som hade många spermier, varför den bild som ges av kattarnas utvecklingsgrad följaktligen är mycket grov.

Värt att ha i åtanke är också att en avsaknad av bevis på spermieförekomst inte är detsamma som bevis på att spermieförekomst saknas. Den postnatala testikelutvecklingen sker inte jämnt fördelat i testikelparenkymet (Sánchez *et al.*, 1993) och de histologiska snitten erbjuder endast stickprovsbilder; följaktligen kan det därför hos de katter som saknade spermier finnas områden i den utforskade delen av testikelparenkymet där utvecklingen har kommit längre och spermier trots allt finns.

Individuell variation och rasskillnader

De första tecknen på att spermatogenesisen startat kunde i denna studie ses redan hos en 2,5 månader gammal katt och den första spermieförekomsten sågs hos två 5 månader gamla katter. Samtidigt fanns det i studien också t.ex. två katter som var 5,5 månader gamla men som fortfarande uppvisade en mycket omogen histologisk bild där alla sädeskanalerna helt saknade lumen och hos en 7 månader gammal katt sågs en spermatogenes som inte hade kommit längre än till runda spermatider. Detta talar för att det finns en ganska stor individuell variation mellan olika katter. Det är också möjligt att det förekommer rasskillnader men då rasuppgifter saknades för flera av de katter som ingick i studien var det emellertid inte möjligt att undersöka detta.

Katten K44

Trots sin relativt höga ålder (33 månader) uppvisade katten K44 en generellt omogen histologisk bild där den stora merparten av sädeskanalerna hade en spermatogenes som inte hade kommit längre än till spermatocyter. Runda eller elongerade spermatider kunde endast ses i ett försvinnande litet antal sädeskanaler. Då resultatet för K44 tydligt avvek från vad som setts hos de övriga katterna i studien och det inte heller i litteraturen gick att hitta något liknande fall har resultatet för denna katt inte bedömts representera en normalvariation. En möjlig orsak till den histologiska bilden hos K44 skulle kunna vara en bakomliggande sjukdom eller utvecklingsrubbing. Scott & Scott (1957) kommenterade i sin studie att testikelvävnadens utvecklingsmönster ändrades vid sjukdom. En annan möjlig förklaring är att kattens ålder har förväxlats och att den egentligen är betydligt yngre.

Resultatjämförelse med andra studier

Trots en noggrann litteratursökning kunde endast en studie (Tsutsui *et al.*, 2004) återfinnas i vilken fokus specifikt legat på att undersöka vid vilken ålder spermier först börjar uppträda i testiklarna hos katt. Indirekt vidrördes emellertid denna frågeställning i ytterligare fyra studier; i en av dessa studier (Kirkpatrick, 1985) var målet att utröna om det hos hankatt finns en säsongsvariation i testikelvikt och testosteron och i de tre andra studierna (Scott & Scott, 1957; Sánchez *et al.*, 1993; Siemieniuch & Wocławek-Potocka, 2007) låg fokus på att

morfologiskt och stereologiskt undersöka kattens postnatale sädeskanalutveckling utifrån ett histologiskt perspektiv.

Studie i vilken fokus specifikt legat på spermieförekomst

I den studie som genomfördes av Tsutsui *et al.* (2004) observerades ingen förekomst av spermier hos de 4 månader gamla katterna (n=6). Vid 5 månaders ålder sågs spermier hos 23,8 % av katterna (n=21), vid 6 månaders ålder hos 65,3 % av katterna (n=49) och vid 7 månaders ålder hos 96,2 % av katterna (n=26). Spermier observerades hos 100 % av katterna som var 8 månader (n=8), 9 månader (n=11), 10 månader (n=11), 11 månader (n=7) respektive 12 månader gamla (n=22). De resultat som Tsutsui *et al.* (2004) redovisar överensstämmer väl med resultaten i detta arbete. I båda studierna har ingen spermieförekomst observerats hos de katter som var yngre än 5 månader och för de katter som var 8 månader eller äldre har, om man räknar bort resultatet för katten K44, spermieförekomst observerats hos samtliga undersökta katter. Att de procentuella resultaten för de andra ålderskategorierna inte överensstämmer med varandra var väntat då ett väldigt begränsat antal katter har använts och varje enskild individs resultat därmed får ett stort genomslag i statistiken.

Övriga studier

Studierna av Scott & Scott (1957), Kirkpatrick (1985), Sánchez *et al.* (1993) och Siemieniuch & Wocławek-Potocka (2007) är svårare att göra en resultatjämförelse med då fokus i dessa studier inte legat på att specifikt undersöka när spermier börjar uppträda. En del jämförelser kan emellertid göras.

I enlighet med vad som setts både i detta arbete och i studien av Tsutsui *et al.* (2004), observerade även Kirkpatrick (1985) spermieförekomst i sädeskanalerna hos samtliga katter som var 8 månader eller äldre och i studien av Sánchez *et al.* (1993) beskrevs spermatogenesisen som "etablerad" när katterna uppnått 8 månaders ålder. Siemieniuch & Wocławek-Potocka (2007) är otydliga i sin resultatpresentation men antingen från eller från och med 8 månaders ålder kunde spermieförekomst observeras hos samtliga undersökta djur (totalt 9 stycken 8 månader gamla katter och 30 stycken katter som var mellan 8-12 månader gamla), vilket även detta ligger i linje med vad som har observerats i detta arbete samt i de tidigare nämnda studierna.

I studien av Scott & Scott (1957) började de första spermatiderna uppträda när testikelvikten var ca 700 mg och de första spermierna när testikelvikten passerade 1g. Dessa katter beskrevs vara i åldern 30-36 veckor, vilket är en relativt hög ålder jämfört med vad som har observerats i de tidigare nämnda studierna samt i detta arbete. Då det verkar finnas en relativt stor individvariation mellan olika katter är det möjligt att dessa resultatskillnader är en avspeglning av att ett begränsat djurunderlag har använts. En annan tänkbar förklaring till resultatskillnaderna är att testikelutvecklingen hos hankatt kan ha förändrats under den relativt långa tid som har förflutit sedan Scott & Scott genomförde sin studie och att hankatter idag börjar producera färdiga spermier vid en yngre ålder än vad hankatterna gjorde 1957. Scott & Scott (1957) undersökte nyfödda kattungar upp till 4 år gamla katter (totalt 54 katter) men då

åldersfördelningen på katterna inte specificerats närmare är det svårt att vidare jämföra resultaten på ett tillfredställande sätt.

Avslutningsvis kunde, i enlighet med vad som setts både i detta arbete och i studien av Tsutsui *et al.* (2004), inte heller Scott & Scott (1957), Sánchez *et al.* (1993) eller Siemieniuch & Wocławek-Potocka (2007) observera någon spermieförekomst hos de katter som var yngre än 5 månader.

Immunohistokemi med GATA-4

Könsceller

Spermatider

Den positiva färgning som sågs i både de runda och de elongerade spermatiderna stämmer till både form, storlek och lokalisation väl överens med akrosomens olika utvecklingsstadier under spermiogenesen (Wrobel & Bergmann, 2006; Schatten & Constantinescu, 2007; Hess & França, 2008). Utseendet överensstämmer också väl med den akrosomfärgning som McClusky *et al.* (2009) rapporterade om i sin studie vilket ytterligare talar för att det är rätt att tolka det som en akrosomfärgning.

I de områden där en stark akrosomfärgning kunde observeras var det väldigt lätt att se vilka celler det var som var spermatider samt se i vilket stadium av spermiogenesen de befann sig. I de områden där endast en svag färgning av akrosomerna kunde observeras drunknade däremot dessa signaler i bakgrundsfärgningen och var därför inte till någon större hjälp för att identifiera spermatiderna.

Att akrosomfärgningen bara kunde ses i GATA-4-glasen och inte i någon av de två negativa kontrollerna (get-IgG och PBS) talar tydligt för att det är GATA-4-antikroppen som har givit upphov till färgningen. Akrosomfärgningen beror dock troligtvis inte på en förekomst av GATA-4-protein i akrosomerna. För det första är GATA-4 en transkriptionsfaktor och dess uttryck borde därför vara nukleärt (Molkentin, 2000; LaVoie, 2003). För det andra har det i försök med både In situ-hybridisering och Northern Blot Analys inte kunnat påvisas någon förekomst av GATA-4-mRNA i spermatiderna (Ketola *et al.*, 1999; Imai *et al.*, 2004). För det tredje har akrosomfärgningen bara observerats när en viss typ av GATA-4-antikropp (C-20, sc-1237, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) har använts. Det mest sannolika är därför istället att det har skett en korsreaktion.

Den typ av GATA-4-antikropp (C-20, sc-1237, Santacruz Biotechnology, Inc., USA) som använts i denna studie har givit upphov till en liknande färgning i spermatiderna även i studier på råtta (McClusky *et al.*, 2009) och hund (Owston & Ramos-Vara, 2007; Ramos-Vara & Miller, 2009) samt i de flesta studier på mus (Ketola *et al.*, 2002; Kyrölähti *et al.*, 2011; Southwood *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2013). I två studier på mus (Ketola *et al.*, 1999; Imai *et al.*, 2004) samt i en studie på gris (McCoard *et al.*, 2001) har dock ingen rapportering om någon sådan färgning rapporterats trots att samma antikropp använts. Att olika resultat har setts i olika studier skulle kunna spegla ras- och djurslagsskillnader. Det är också möjligt att försökstekniska aspekter kan ha bidragit; även om samma primära antikropp har använts så

finns det mycket annat – t.ex. fixering, epitopåtervinning, spädning och inkubationstid för antikropparna samt detektionsmetod – som har varierat mellan de olika studierna och som kan ha påverkat resultatet. Eftersom det rör sig om flera olika variabler och det i de flesta av studierna endast finns en väldigt knapphändig beskrivning av material och tillvägagångssätt är det svårt att jämföra studierna med varandra.

Övriga könsceller

Att ingen positiv GATA-4-immunoreaktivitet sågs i spermatogonier, spermatocyter eller spermier ligger i linje med vad som har rapporterats för postnatale djur i de flesta andra studier där GATA-4-antikroppar har använts (Ketola *et al.*, 1999; McCoard *et al.*, 2001; Ketola *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2004; Ramos-Vara & Miller, 2009). Viger *et al.* (1998) och Ketola *et al.* (2000) var de enda två studier som hade resultat som avvek från detta.

Sertoliceller

Att Sertolicellerna hos alla katter utom K3 var negativa var ett oväntat resultat då ett positivt uttryck av GATA-4 har kunnat påvisas immunohistokemiskt i Sertolicellkärnor under hela den prenatala och postnatale testikelutvecklingen upp till och med vuxen ålder hos både mus (Ketola *et al.*, 1999; Ketola *et al.*, 2002; Anttonen *et al.*, 2003; Imai *et al.*, 2004; Bielinska *et al.*, 2007), gris (McCoard *et al.*, 2001) och människa (Ketola *et al.*, 2000).

Det är möjligt att det finns djurslagsskillnader och att det hos katt endast är de allra yngsta individerna som uttrycker GATA-4 i sina Sertoliceller. Att katterna K6 och K7 hade negativa Sertoliceller trots att de utvecklingsmässigt och åldermässigt låg på ungefär samma nivå som K3 samt att immunohistokemi är en erkänt svårbemästrad analysmetod (Taylor & Rudbeck, 2013) talar emellertid för att det istället rör sig om ett falskt negativt resultat hos alla katter utom K3. Det finns många olika tänkbara försökstekniska orsaker som kan ligga bakom.

I sädeskanalerna hos den katt (K3) där en positiv färgning av Sertoliceller sågs underlättades särskiljandet mellan Sertoliceller och spermatogonier enormt av GATA-4-färgningen. Om Sertolicellerna hos de andra katterna är falskt negativa och detta går att lösa skulle därför användbarheten av GATA-4-immunohistokemi som redskap öka ytterligare.

Fixering

Epitopmaskering orsakad av fixeringen är en av de vanligaste orsakerna till misslyckad antigen-detektion (Harlow & Lane, 1999; Ramos-Vara & Miller, 2014). Modifierad Davidsons fixeringslösning har inte använts för att fixera testikelvävnaden i någon av de tidigare nämnda GATA-4-studierna men har i en annan GATA-4-orelaterad studie givit ett mycket bra resultat för immunohistokemisk färgning av andra testikulära antigen (Latendresse *et al.*, 2002). Att modifierad Davidsons lösning har visat sig fungera väl för IHC med andra antigen är emellertid inte en garanti för att det ska fungera även med detta antigen; olika fixeringsmedel fungerar olika bra för olika antigen och olika immunohistokemiska protokoll (Ramos-Vara & Miller, 2014) och det är därför möjligt att Davidsons lösning inte var det optimala valet i detta fall. En annan möjlighet är att det var ett välfungerande val men att vävnaden har blivit antingen över- eller underfixerad; båda dessa kan leda till en förlust av antigen-detektion (Harlow & Lane, 1999; Ramos-Vara & Miller, 2014).

Epitopåtervinning

Det finns ingen universalmetod för epitopåtervinning utan vad som fungerar bäst varierar från fall till fall och är beroende av bl.a. antigenets egenskaper samt vilken typ av fixering som använts (Renshaw, 2007; Ramos-Vara & Miller, 2014). Det är därför möjligt att antingen en modifiering av den epitopåtervinningsteknik som redan har använts (t.ex. genom att ändra kokningstiden eller byta till en annan buffert) eller ett byte till en helt annan teknik (t.ex. PIER) skulle generera ett bättre resultat. En del epitopmaskeringar är emellertid oåterkalleliga oavsett vilken epitopåtervinning som provas (Ramos-Vara & Miller, 2014).

Vävnadsnedbrytning

Vävnadsnedbrytning kan orsaka både antigendiffusion och epitopmaskering (Taylor & Rudbeck, 2013) och är därför en möjlig orsak till det negativa resultatet. När en morfologisk bedömning (opublicerade resultat) av testikelvävnaden gjordes (i de H&E-färgade snitt som fixerats i modifierad Davidsons fixeringslösning) varierade morfologin mycket mellan olika katter. Att den enda katt som hade positiva Sertolicellkärnor också var den katt som hade den morfologiskt finaste testikelvävnaden samt bara 1 timme från kastrering till fixering talar för att vävnadsnedbrytning kan ha påverkat antigendetektionen. Jämförelsen mellan olika katter försvåras dock av att ingen tydlig koppling sågs mellan vävnadsmorfologi och tid till fixering; t.ex. fanns det en annan katt som hade lika kort tid till fixering som K3 men som hade en betydligt sämre vävnadsmorfologi och omvänt fanns det två katter som hade nästan lika fin morfologi som K3 men där tiden till fixering var längre.

Antikroppar

Den typ av GATA-4-antikropp som använts i detta försök är producerad mot GATA-4-protein från mus men ska enligt tillverkaren även reagera mot GATA-4-protein från råtta, människa, häst, hund, nötkreatur, svin och fågel (Santa Cruz Biotechnology, 2013). En positiv färgning av Sertolicellerna har också setts i studier på flera olika djurslag (Ketola *et al.*, 1999; Ketola *et al.*, 2000; McCoard *et al.*, 2001; Ketola *et al.*, 2002; Anttonen *et al.*, 2003; Imai *et al.*, 2004; Bielinska *et al.*, 2007; Owston & Ramos-Vara, 2007; Ramos-Vara & Miller, 2009; Southwood *et al.*, 2012; Gassei & Orwig, 2013; Hussain *et al.*, 2013). Det är dock möjligt att GATA-4-proteinet hos katt skiljer sig tillräckligt mycket från musens GATA-4-protein för att antikropparna inte ska känna igen det. Möjligheten att det skulle vara något fel på denna antikroppsbatch är också något som aldrig kan uteslutas om inte tester har gjorts med positiva kontroller. Både för höga och för låga antikroppskoncentrationer av primära eller sekundära antikroppar kan också leda till en förlust av antigendetektion (Taylor & Rudbeck, 2013). Att K3 hade ett positivt resultat talar emellertid för att antikropparna fungerar.

Negativa kontroller

Att den ena typen av negativ kontroll (getIgG) inte var negativ är ett stort problem då detta talar för att det finns försökstekniska problem som kan ha lett till falskt positiva resultat även i GATA-4-glasen. Innan detta problem har lösts kan därför inte resultaten anses tillförlitliga.

Bakgrundsfärgning

Det finns många olika bakomliggande mekanismer till varför bakgrundsfärgning kan uppstå, t.ex. endogen enzymaktivitet, endogent biotin, ospecifik vidhäftning, kontaminerande och

naturliga antikroppar, antigendiffusion och korsreagerande antikroppar. För flera av dessa mekanismer kan bakgrundsfärgningen förvärras av olika faktorer som t.ex. uttorkning av vävnaden, överfixering, underfixering, vävnadsautolys, otillräcklig tvättning, kvarvarande paraffinrester, för höga antikropps-koncentrationer samt för långa inkubationstider. (Harlow & Lane, 1999; Taylor & Rudbeck, 2013)

Några förändringar av IHC-protokollet har redan prövats för att komma till rätta med bakgrundsfärgningen (se Tabell 2). Som en del av felsökningsprocessen lades också en ny negativ kontroll (PBS) till.

Att bakgrundsfärgning sågs hos GATA-4-glasen och get-IgG-glasen men inte hos PBS-glasen talar för att problemet har en koppling till den primära antikroppen och get-IgG:t. För höga antikropps-koncentrationer eller för långa inkubationstider i förhållande till den inkubationstemperatur som använts kan leda till kraftig bakgrundsfärgning. Det är vanligt att många olika antikropps-koncentrationer måste testas innan rätt koncentration hittas (Harlow & Lane, 1999) och i detta försök har endast en koncentration testats. I de tidigare nämnda GATA-4-studierna har, i de fall detta specificeras, en spädning på mellan 1:100-1:500 (Ketola *et al.*, 2000; McCoard *et al.*, 2001; Ketola *et al.*, 2002; Anttonen *et al.*, 2003; Imai *et al.*, 2004) och en inkubationstid på 60-90 minuter i antingen rumstemperatur (McCoard *et al.*, 2001; Imai *et al.*, 2004) eller 37,8°C (Anttonen *et al.*, 2003) använts. Detta skiljer sig ifrån den spädning (1:50) och den inkubationstid (cirka 17 h i 4°C) som har använts i denna studie.

KONKLUSION

Frågeställning 1: Spermieförekomst

Resultatet från denna studie tyder på att det finns en individuell variation för när spermier börjar ses i testiklarna hos hankatter. Generellt börjar dock inte spermier ses i testiklarna förrän tidigast när hankatterna har uppnått 5 månaders ålder och när hankatterna har blivit 8 månader gamla har generellt alla spermier i sina testiklar. Detta ligger också i linje med de flesta andra studier.

Frågeställning 2: GATA-4-immunohistokemi

Immunohistokemi med GATA-4-antikroppar har visat sig kunna underlätta särskiljandet av olika celltyper i sädesepitelet men innan det kan användas som ett effektivt hjälpmedel finns det en rad problem som behöver åtgärdas. Först och främst behöver problemen med den kraftiga bakgrundsfärgningen och de negativa kontrollerna som inte är negativa lösas. Sedan vore det önskvärt med ett jämnare resultat av akrosomfärgningen. Om det även går att få en positiv färgning av Sertolicellerna skulle användbarheten av GATA-4-immunohistokemi som redskap öka ytterligare. I denna studie har på grund av tidsbrist endast ett begränsat antal problemlösningsåtgärder testats. Det finns många åtgärder (t.ex. optimering av antikropps-koncentrationerna) kvar att testa och om problemen angrips på ett systematiskt sätt, en protokollförändring i taget, är det mycket möjligt att ett bra resultat i slutändan kan uppnås. Trots de relativt dåliga resultaten i denna studie är det därför för tidigt att utesluta immunohistokemi med GATA-4-antikroppar som ett användbart redskap vid studier på spermieutveckling hos katt.

REFERENSER

- Anttonen, M., Ketola, I., Parviainen, H., Pusa, A.K. & Heikinheimo, M. (2003). FOG-2 and GATA-4 are Coexpressed in the Mouse Ovary and Can Modulate Müllerian-Inhibiting Substance Expression. *Biology of Reproduction*, 68(4): 1333-1340.
- Bielinska, M., Seehra, A., Toppari, J., Heikinheimo, M. & Wilson, D.B. (2007). GATA-4 Is Required for Sex Steroidogenic Cell Development in the Fetal Mouse. *Developmental Dynamics*, 236(1): 203-213.
- Bouma, G.J., Washburn, L.L., Albrecht, K.H. & Eicher, E.M. (2007). Correct Dosage of Fog2 and Gata4 Transcription Factors is Critical for Fetal Testis Development in Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(38):14994-14999.
- Bratthauer, G.L. (2010a). Overview of Antigen Detection Through Enzymatic Activity. *Methods in Molecular Biology*, 588: 231-241.
- Bratthauer, G.L. (2010b). The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods in Molecular Biology*, 588: 257-270.
- Buchwalow, I.B. & Böcker, W. (2010). *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.
- Cheng, C.Y. & Mruk, D.D. (2012). The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacological Reviews*, 64(1):16-64.
- Clermont, Y. (1972). Kinetics of Spermatogenesis in Mammals: Seminiferous Epithelium Cycle and Spermatogonial Renewal. *Physiological Reviews*, 52(1): 198-236.
- Damber, J.E. & Söder, O. (1994). Funktionell morfologi. I: Fredricsson, B & Pousette, Å. (red), *Andrologi*. Stockholm: Liber Utbildning AB, 11-23.
- França, L.R. & Godinho, C.L. (2003). Testis Morphometry, Seminiferous Epithelium Cycle Length, and Daily Sperm Production in Domestic Cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, 68(5): 1554-1561.
- Gartner, L.P. & Hiatt, J.L. (2007). *Color Textbook of Histology*. 3. ed. St. Louis: Elsevier Saunders.
- Gassei, K. & Orwig, K.E. (2013). SALL4 Expression in Gonocytes and Spermatogonial Clones of Postnatal Mouse Testes. *PLoS ONE*, 8(1): e53976.
- Harlow, E. & Lane, D. (1999). *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hess, R.A. & França, L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 636: 1-15.

- Hussain, S., Tuorto, F., Menon, S., Blanco, S., Cox, C., Flores, J.V., Watt, S., Kudo, N.R., Lyko, F. & Fryea, M. (2013). The Mouse Cytosine-5 RNA Methyltransferase NSun2 Is a Component of the Chromatoid Body and Required for Testis Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 33(8): 1561-1570.
- Imai, T., Kawai, Y., Tadokoro, Y., Yamamoto, M., Nishimune, Y. & Yomogida, K. (2004). In Vivo and In Vitro Constant Expression of GATA-4 in Mouse Postnatal Sertoli Cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 214: 107-115.
- Jung H., Roser J.F. & Yoon M. (2014). UTF1, a Putative Marker for Spermatogonial Stem Cells in Stallions. *PLoS ONE*, 9(10): e108825.
- Ketola, I., Anttonen, M., Vaskivuo, T., Tapanainen, J.S., Toppari, J. & Heikinheimo, M. (2002). Developmental Expression and Spermatogenic Stage Specificity of Transcription Factors GATA-1 and GATA-4 and Their Cofactors FOG-1 and FOG-2 in the Mouse Testis. *European Journal of Endocrinology*, 147(3): 397-406.
- Ketola, I., Pentikäinen, V., Vaskivuo, T., Ilvesmäki, V., Herva, R., Dunkel, L., Tapanainen, J.S., Toppari, J. & Heikinheimo, M. (2000). Expression of Transcription Factor GATA-4 during Human Testicular Development and Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(10): 3925-3931.
- Ketola, I., Rahman, N., Toppari, J., Bielinska, M., Porter-Tinge, S.B., Tapanainen, J.S., Huhtaniemi, I.T., Wilson, D.B. & Heikinheimo, M. (1999). Expression and Regulation of Transcription Factors GATA-4 and GATA-6 in Developing Mouse Testis. *Endocrinology*, 140(3):1470-1480.
- Kierszenbaum, A.L. & Tres, L.L. (2012). *Histology and Cell Biology: an Introduction to Pathology*. 3. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Kirkpatrick, J.F. (1985). Seasonal testosterone levels, testosterone clearance, and testicular weights in male domestic cats. *Canadian Journal of Zoology*, 63(6): 1285-1287.
- Kustritz, M. V. R. (2014). Applied Small Animal Andrology. I: Chenoweth, P.J. & Lorton, S. (ed.), *Animal Andrology: Theories and Applications*. Wallingford: CABI, 177-196.
- Kyrölahti, A., Euler, R., Bielinska, M., Schoeller, E.L., Moley, K.H., Toppari, J., Heikinheimo, M. & Wilson, D.B. (2011). GATA4 Regulates Sertoli Cell Function and Fertility in Adult Male Mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 333(1): 85-95.
- Latendresse, J.R., Warbritton, A.R., Jonassen, H. & Creasy, D.M. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's Fluid. *Toxicologic Pathology*, 30(4): 524-533.
- LaVoie, H.A. (2003). The Role of GATA in Mammalian Reproduction. *Experimental Biology and Medicine*, 228(11):1282-1290.

- McClusky, L.M., Patrick, S., Barnhoorn, I.E.J., van Dyk, J.C., de Jager, C. & Bornman, M.S. (2009). Immunohistochemical Study of Nuclear Changes Associated With Male Germ Cell Death and Spermiogenesis. *Journal of Molecular Histology*, 40(4): 287-299.
- McCoard, S.A., Lunstra, D.D., Wise, T.H. & Ford, J.J. (2001). Specific Staining of Sertoli Cell Nuclei and Evaluation of Sertoli Cell Number and Proliferative Activity in Meishan and White Composite Boars During the Neonatal Period. *Biology of Reproduction*, 64(2): 689-695.
- Mescher, A.L. (2013). *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas*. 13. ed. New York: The McGraw-Hill Companies.
- Molkentin, J.D. (2000). The Zinc Finger-containing Transcription Factors GATA-4, -5, and -6. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (50): 38949–38952.
- Nybo, K. (2012). Immunohistochemistry: background staining. *BioTechniques*, 53: 282-283.
- Owston, M.A. & Ramos-Vara, J.A. (2007). Histologic and Immunohistochemical Characterization of a Testicular Mixed Germ Cell Sex Cord-Stromal Tumor and a Leydig Cell Tumor in a Dog. *Veterinary Pathology*, 44: 936-943.
- Patient, R.K. & McGhee, J.D. (2002). The GATA Family (Vertebrates and Invertebrates). *Current Opinion in Genetics and Development*, 12(4): 416-422.
- Ramos-Vara, J.A. & Miller, M.A. (2009). Immunohistochemical Evaluation of GATA-4 in Canine Testicular Tumors. *Veterinary Pathology*, 46: 893-896.
- Ramos-Vara, J.A. & Miller, M. A. (2014). When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry – The Red, Brown, and Blue Technique. *Veterinary Pathology*, 51(1): 42-87.
- Raymond, C.S., Kettlewell, J.R., Hirsch, B., Bardwell, V.J. & Zarkower, D. (1999). Expression of Dmrt1 in the Genital Ridge of Mouse and Chicken Embryos Suggests a Role in Vertebrate Sexual Development. *Developmental Biology*, 215(2): 208-220.
- Renshaw, S. (2007). Immunochemical Staining Techniques. I: Renshaw, S. (ed.), *Immunohistochemistry*. Banbury: Scion Publishing Ltd, 45-96.
- Sánchez, B., Pizarro, M., García, P. & Flores, J.M. (1993). Postnatal Development of Seminiferous Tubules in the Cat. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 47: 343-348.
- Santa Cruz Biotechnology (2013-04-18). *Data Sheet: GATA-4 (C-20): sc-1237*
<http://datasheets.scbt.com/sc-1237.pdf> [2014-11-19]

- Schatten, H. & Constantinescu, G.M. (ed.) (2007). *Comparative Reproductive Biology*. Ames: Blackwell Publishing, 61-115.
- Scott, M.G. & Scott, P.P. (1957). Post-natal development of the testis and epididymis in the cat. *The Journal of Physiology*, 136(2): 40-41.
- Siemieniuch, M.J. & Wocławek-Potocka, I. (2007). Morphological features of the seminiferous epithelium in cat (*Felis catus*, L. 1758) testes. *The Journal of Reproduction and Development*, 53(5): 1125-30.
- Southwood, C.M., Lipovich, L. & Gow, A. (2012). Tissue-Restricted Transcription from a Conserved Intragenic CpG Island in the *Klf1* Gene in Mice. *Biology of Reproduction*, 87 (5):108, 1–12.
- Tang, Y., Wei, Y., He, W., Wang, Y., Zhong, J. & Qin, C. (2014). GATA Transcription Factors in Vertebrates: Evolutionary, Structural and Functional Interplay. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(2): 203–214.
- Taylor, C.R. & Rudbeck, L. (ed.) (2013). *Immunohistochemical Staining Methods*. 6. ed. Glostrup: DAKO Denmark A/S.
- Tevosian, S.G., Albrecht, K.H., Crispino, J.D., Fujiwara, Y., Eicher, E.M. & Orkin, S.H. (2002). Gonadal Differentiation, Sex Determination and Normal Sry Expression in Mice Require Direct Interaction Between Transcription Partners GATA4 and FOG2. *Development*, 129(19): 4627-4634.
- Tizard, I. (2013). *Veterinary Immunology*. 9. ed. St. Louis: Elsevier Saunders.
- Tsutsui, T., Kuwabara, S., Kuwabara, K., Kugota, Y., Kinjo, T. & Hori, T. (2004). Development of spermatogenic function in the sex maturation process in male cats. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 66(9): 1125-1127.
- Viger, R.S., Mertineit, C., Trasler, J.M. & Nemer, M. (1998). Transcription Factor GATA-4 is Expressed in a Sexually Dimorphic Pattern During Mouse Gonadal Development and is a Potent Activator of the Müllerian Inhibiting Substance Promoter. *Development*, 125(14): 2665-2675.
- Wrobel, K-H. & Bergmann, M. (2006). Male Reproductive System. I: Eurell, J.A. & Frappier, B.L. (ed.), *Textbook of Veterinary Histology*. 6. ed. Ames: Blackwell Publishing, 233-255.